

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1909-1910

N° 9

SUR

LE MÉCANISME DE LA DÉNITRIFICATION

PAR LES BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES INDIRECTES

THÈSE

Pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université
de Paris (Pharmacie).

Présentée et soutenue le 7 Avril 1910

PAR

MAURICE BAGROS

Pharmacien de 1^{re} classe,
Ex-Préparateur de Chimie biologique à l'École supérieure de Pharmacie,
Ancien Interne lauréat des hôpitaux de Paris (*Médaille d'Argent*, 1905),
Lauréat de l'École supérieure de Pharmacie (*Médaille de Bronze*, 1904 ;
Médaille d'Argent, 1905).

JURY

{ MM. GRIMBERT, Président.
LEBEAU, Professeur.
BOUGAULT, Agrégé.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1. RUE CASSETTE, 1

1910

UNIVERSITÉ DE PARIS

ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1909-1910

N° 9

SUR

LE MÉCANISME DE LA DÉNITRIFICATION

PAR LES BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES INDIRECTES

THÈSE

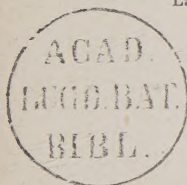
Pour l'obtention du Diplôme de Docteur de l'Université
de Paris (Pharmacie).

Présentée et soutenue le 7 Avril 1910

PAR

MAURICE BAGROS

Pharmacien de 1^{re} classe,
Ex-Préparateur de Chimie biologique à l'École supérieure de Pharmacie,
Ancien Interne lauréat des hôpitaux de Paris (*Médaille d'Argent*, 1905),
Lauréat de l'École supérieure de Pharmacie (*Médaille de Bronze*, 1904 ;
Médaille d'Argent, 1905).



JURY

{ MM. GRIMBERT, Président.
LEBEAU, Professeur.
BOUGAULT, Agrégé.

PARIS

IMPRIMERIE DE LA COUR D'APPEL

L. MARETHEUX, Directeur

1, RUE CASSETTE, 1

1910

PERSONNEL DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. GUIGNARD, Directeur, Membre de l'Institut, O. ✱, ☉ I.
BOUCHARDAT, Assesseur, O. ✱, ☉ I.
E. MUSSON, Secrétaire. ☉ I.

PROFESSEURS

MM. BOUCHARDAT, O. ✱, ☉ I. Hydrologie et minéralogie.
GUIGNARD, Membre de l'Institut, O. ✱, ☉ I. Botanique générale.
VILLIERS, ✱, ☉ I. Chimie analytique.
BOURQUELOT, ✱, ☉ I. Pharmacie galénique.
GAUTIER, ✱, ☉ I. Chimie minérale.
RADAIS, ☉ I. Cryptogamie.
BÉHAL, ✱, ☉ I. Chimie organique.
PERROT, ✱, ☉ I. Matière médicale.
COUTIÈRE, ☉ I. Zoologie.
BERTHELOT, ☉ I. Physique.
GRIMBERT, ☉ I. Chimie biologique.
MOUREU, ✱, ☉ I. Pharmacie chimique.
LEBEAU, ☉ I. Toxicologie.

Professeurs honoraires : MM. MARCHAND, ☉ I. ;
JUNGFLEISCH, O. ✱, ☉ I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. GUERBET, ☉ I.	MM. GUÉRIN, ☉ I.
DELÉPINE, ☉ I.	GUEGUEN, ☉ I.
VALEUR, ☉ A.	LUTZ, ☉ I.
BOUGAULT, ☉ A.	HÉRISSEY, ☉ I.
TASSILLY, ☉ I.	

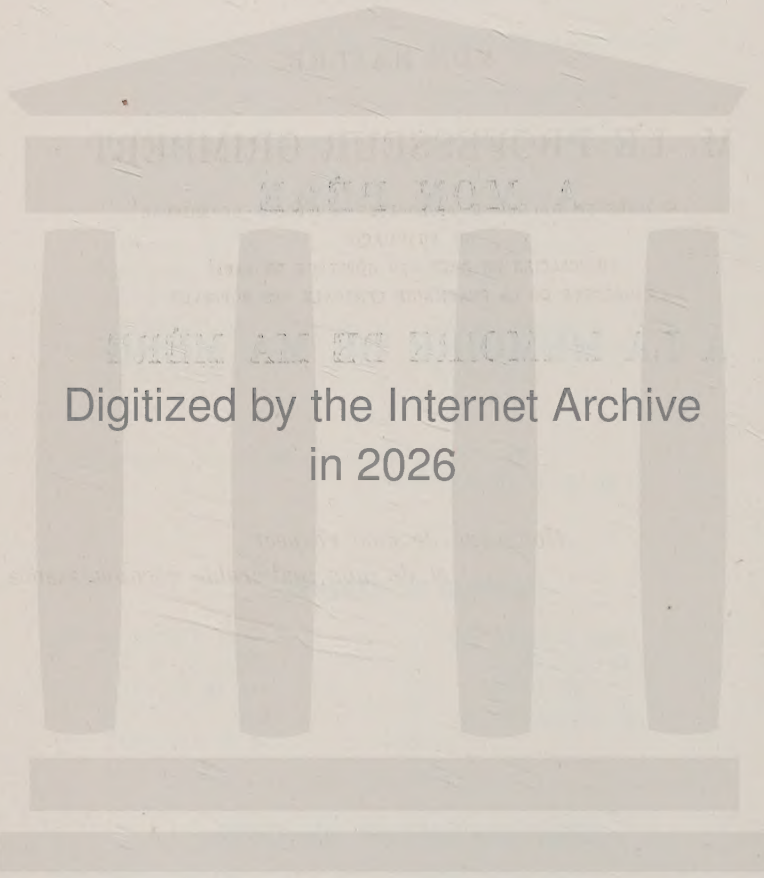
CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, ☉ I. Chimie générale.
COUSIN, ☉ I. Chimie analytique.
GORIS, ☉ I. Micrographie.
MOURLOT, ☉ I. Physique.
BARTHELAT, ☉ I. Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. JAVILLIER, ☉ A.
Bibliothécaire : M. DORVEAUX, ☉ I

A MON PÈRE

A LA MÉMOIRE DE MA MÈRE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

A MON MAITRE

M. LE PROFESSEUR GRIMBERT

PROFESSEUR DE CHIMIE BIOLOGIQUE A L'ÉCOLE SUPÉRIEURE
DE PHARMACIE

PHARMACIEN EN CHEF DES HÔPITAUX DE PARIS
DIRECTEUR DE LA PHARMACIE CENTRALE DES HÔPITAUX

*Hommage de mon respect
et de mon inaltérable reconnaissance.*

A M. LE PROFESSEUR CHAUFFARD

PROFESSEUR D'HISTOIRE DE LA MÉDECINE ET DE LA CHIRURGIE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE

MEMBRE DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE

MÉDECIN DE L'HÔPITAL COCHIN

Hommage de respectueux dévouement.

MEIS ET AMICIS

SUR LE MÉCANISME DE LA DÉNITRIFICATION

PAR LES BACTÉRIES DÉNITRIFIANTES INDIRECTES

AVANT-PROPOS

Je tiens, avant de commencer l'exposé des travaux effectués en vue de cette thèse, à adresser l'hommage de ma plus vive reconnaissance à tous ceux qui, par leur concours, m'en ont facilité la tâche :

A mon Maître, M. le professeur GRIMBERT, auprès de qui j'ai toujours trouvé le plus bienveillant accueil, et dont les conseils m'ont été d'un puissant secours ;

A M. le professeur GAUTIER, qui voulut bien m'accorder l'hospitalité au Laboratoire de Chimie minérale pendant le temps que dura l'installation du Laboratoire de Chimie biologique ;

A M. le professeur LEBEAU, pour la bienveillance avec laquelle il a consenti à me prêter son concours et à mettre à ma disposition les appareils qui m'ont été de la plus grande utilité pour les analyses de gaz.

Je ne saurais oublier non plus les témoignages de sympathie dont j'ai été constamment l'objet de la part de M. le professeur CHAUFFARD pendant le temps que j'ai passé dans son service comme

interne en Pharmacie, et dont je garderai toujours un souvenir reconnaissant.

Enfin j'adresse l'expression de toute ma gratitude à M. COUSIN, pharmacien en chef de l'hôpital Cochin, et à M. le professeur QUÉNU, mon premier maître d'internat, pour l'accueil bienveillant que j'ai sans cesse trouvé auprès d'eux.

HISTORIQUE

La décomposition des nitrates par les bactéries est un fait assez anciennement connu, mais les premiers travaux effectués en vue d'expliquer ce phénomène, remontent à peine à une quarantaine d'années. Les premiers expérimentateurs attribuèrent cette destruction à l'action des matières organiques sans tenir compte du rôle que pouvaient y jouer les infiniment petits.

La destruction des nitrates fut signalée pour la première fois en 1867 par ANGUS SCHMITH (3), qui remarqua ce phénomène sans même chercher à l'expliquer, dans l'eau d'égout.

Un an plus tard, REISET (34) remarque que pendant la fermentation du jus de betterave il se forme du gaz nitreux, à condition que ce jus renferme une très petite quantité d'acide libre; et en effet, il arrêta la fermentation en ajoutant au milieu de l'acide sulfurique. Lorsque ce dernier atteignait la proportion de 3 grammes de SO_4H^2 normal par litre, tout dégagement gazeux cessait. Pour lui, cette quantité d'acide était celle qui suffisait à saturer l'ammoniaque libre et il en conclut que le gaz nitreux était dû à l'oxydation de l'ammoniaque.

La même année, SCHLÆSING (39) s'élève contre la théorie de REISET, fournissant à l'appui de sa thèse des observations faites sur le jus de betterave en fermentation. Un observateur, REV, avait avant lui remarqué que pendant cette fermentation il se dégageait du protoxyde d'azote mêlé d'acide carbonique; et lui-même ayant repris ces expériences, eut l'idée de doser les nitrates dans le jus de tabac avant et après fermentation. Il constata ainsi que le dégagement nitreux cessait lorsqu'il ne restait plus de nitrates; d'où il en conclut que le gaz nitreux provenait, non de l'ammoniaque, mais du nitrate.

Il remarqua en outre que, dans la fermentation ammoniacale de l'urine et dans la fermentation lactique des solutions sucrées, il

se dégageait des composés oxygénés de l'azote, ces réactions ne se produisant d'ailleurs qu'en milieu neutre ou alcalin. La réduction des nitrates en composés moins oxygénés lui parut dès lors être comparable à la réduction des sulfates en sulfures sous l'action des matières organiques, réduction qui, elle aussi, est empêchée par les acides.

Une autre expérience faite par lui (40) ne fit que le confirmer dans cette idée : il faisait passer des volumes connus d'air et d'azote dans une terre calcaire, et il constatait que lorsqu'il soumettait l'azote seul à ce passage au travers de cette terre, les nitrates préexistants disparaissaient totalement. Il était ainsi amené à cette conclusion que l'action réductrice était due à la matière organique.

C'est seulement en 1875 que fut émise pour la première fois l'idée du rôle des microorganismes dans la dénitrification. MEUSEL (31) ayant constaté la présence des nitrites dans une eau, qui, fraîche, ne contenait que des nitrates, supposa que cette action pouvait être due à des bactéries, car la même eau, ayant été additionnée d'un antiseptique (acide phénique, acide salicylique, acide benzoïque, etc.), n'était plus susceptible de s'appauvrir en nitrates. Il remarqua en outre, au microscope, la présence des bactéries. Enfin la réduction des nitrates alcalins en solution dans l'eau pure ne se produisait que si l'on ajoutait à celle-ci des hydrates de carbone (amidon, cellulose, sucres, etc.).

En 1879, SCHLÖESING et MÜNTZ (41), puis WARINGTON (50), dans leurs études sur la nitrification constatent la formation fréquente de nitrites, mais il ne semble pas qu'ils se soient trouvés en présence de phénomènes de réduction.

Pour WARINGTON, dans les solutions diluées nitrifiées à l'obscurité, il ne se formerait que des nitrates, tandis que dans les solutions concentrées ou nitrifiées à la lumière ou à haute température, il ne se formerait que des nitrites. Il attribue ces différences à des propriétés particulières du ferment, que d'ailleurs il ne cherche pas à mieux définir.

Deux ans plus tard, WARINGTON (52) remarque qu'en arrosant de la terre avec une solution de nitrate, celle-ci se trouve réduite dans de telles proportions, qu'après une semaine 79 % du nitrate ont été détruits.

En 1882, GAYON et DUPETIT (18) instituent les premiers des expériences ayant pour but l'étude de la destruction des nitrates. Partant de ce fait que la nitrification est due au développement

de microbes aérobies, ils supposent que la réduction des nitrates est, elle aussi, un phénomène physiologique.

Ilsensemencèrent avec de l'urine, de l'eau d'égout, puis du bouillon de poule qui avaient été additionnés d'une faible proportion de nitrates. Dans chacun de ces milieux, ils ont constaté la disparition d'une quantité de nitrate atteignant jusqu'à 10 %. Cette réduction cessait par l'addition d'un antiseptique ou d'un anesthésique, elle était donc due aux microbes.

De plus, l'action de l'air l'empêchait en partie ou en totalité. Ils remarquèrent en outre que ce phénomène se produisait le plus favorablement vers 35 à 40° centigrades, et que la présence des matières organiques, mais de certaines seulement, telles que la glycérine, le glycol, les alcools de la série grasse, les sucres et surtout l'alcool propylique, était nécessaire.

Le phénol à dose antiseptique ne gêne pas la dénitrification, tandis qu'il empêche la nitrification; l'acide salicylique agit de même, mais comme il est facilement détruit par les moisissures, la nitrification peut avoir lieu par la suite.

Dans tous ces milieux, la décomposition des nitrates revêt les allures d'une fermentation énergique; il se dégage de l'azote pur provenant en grande partie du nitrate, tandis que le reste forme de l'ammoniaque et peut-être des *dérivés amidés de la matière organique employée*. Quant à l'oxygène, il est brûlé et donne de l'acide carbonique qui se fixe sur la base du nitrate pour donner des carbonates et des bicarbonates.

Tous ces faits furent confirmés par DEHÉRAIN et MAQUENNE (10), qui remarquèrent que la disparition des nitrates dans la terre arable ne se produisait que si celle-ci était pauvre en oxygène et renfermait des matières organiques; que la stérilisation à 110-120°, ou l'action du chloroforme, faisait cesser toute destruction.

Ils vont plus loin que GAYON et DUPETIT dans leur interprétation des faits, car ils admettent que l'agent dénitrifiant qui existe dans la terre est le *Bacillus amylobacter*, et que la réduction des nitrates en nitrites est produite par l'hydrogène qui provient de la fermentation butyrique.

Dès maintenant, les recherches sur la dénitrification se poursuivent activement. ANGUS SCHMITH (4), le même qui, en 1867, avait signalé la disparition des nitrates dans l'eau d'égout, remarqué que la quantité d'azote qui se dégage dans la fermentation

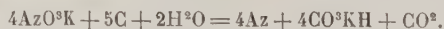
des nitrates correspond exactement à l'azote provenant du nitrate détruit.

Puis JOULIE (28), se préoccupant de la perte d'azote que subit l'agriculture dans la putréfaction du fumier, signale la perte à l'état d'ammoniaque, mais semble ignorer la disparition des nitrates.

Il est intéressant de citer en passant la curieuse observation de WARINGTON (53), d'après laquelle une destruction totale des nitrates préexistants précéderait toujours le début de la nitrification, les bacilles dénitrifiants se montrant ainsi doués d'une vitalité beaucoup plus grande que les bacilles nitrifiants.

Nous arrivons ainsi en 1885, époque à laquelle GAYON et DUPE-
TIT (19) publièrent le résultat de leurs intéressants travaux sur la dénitrification. Ils rappellent que la réduction des nitrates a été observée dans de nombreux milieux tels que le jus de betterave, le jus de tabac, l'urine, l'eau d'égout, la terre végétale, etc., mais que jamais aucun microbe n'a été isolé, exception faite du *Bacillus amylobacter*, signalé par DEHÉRAIN et MAQUENNE. Ils démontrent que ce bacille a été pris à tort par ces auteurs pour un agent dénitrifiant, car, en culture pure, il ne produit aucune destruction de nitrate (19).

GAYON et DUPETIT isolèrent d'abord des bacilles qui n'avaient qu'un pouvoir dénitrifiant limité, susceptible de réduire les nitrates en nitrites sans aucun dégagement gazeux; ce n'est que plus tard qu'ils isolèrent de l'eau d'égout nitratée dans la proportion de 10 ‰, deux bacilles nouveaux : le *Bacterium denitrificans* α et le *B. denitrificans* β , ayant un pouvoir dénitrifiant très voisin et susceptibles de dégager, suivant la richesse du milieu, tantôt de l'azote seul, tantôt de l'azote et de l'acide carbonique. D'après les auteurs, la réduction dans ce dernier cas paraît pouvoir être schématisée par l'équation suivante :



Le carbone représenté dans cette équation est fourni par la matière organique, et il est facile de remarquer que si la matière organique n'est pas assez riche en carbone par rapport à la quantité de nitrate qu'elle contient, la réaction ne peut se poursuivre, à moins que l'on ne substitue au carbone devenu insuffisant, celui d'une matière organique non azotée, telle que le glucose, l'amidon, le lactate de chaux, etc. Lorsque le *Bacterium denitrifi-*

cans α est cultivé sur le milieu artificiel de GAYON (acide citrique, asparagine, phosphate de potasse, sulfate de magnésie, etc.), la destruction du nitrate se produit et les gaz recueillis sont de l'azote, du protoxyde d'azote et de l'acide carbonique.

D'après GAYON et DUPETIT, la décomposition des nitrates par le *Bacterium denitrificans* n'est ni une fermentation proprement dite, ni un phénomène secondaire: c'est une combustion des matières organiques par l'oxygène nitrique, combustion qui se produit avec dégagement d'une grande quantité de chaleur. C'est le type des fermentations qui ne peuvent s'accomplir que par le concours simultané de plusieurs réactions chimiques.

A partir de ce moment, la propriété que possèdent certaines bactéries de détruire les nitrates fut considérée comme une propriété spéciale, et les microbes chez lesquels ce pouvoir avait déjà été constaté furent examinés à ce point de vue particulier.

HERÆUS (23), étudiant la propriété dénitrifiante du *Bacillus prodigiosus* et du *Bacillus racemosus*, constate à son tour ce pouvoir, mais attribue à l'action de la matière organique la formation des nitrites.

A la même époque, MUNRO (32), poursuivant les recherches de SCHLÆSING, MÜNTZ et WARINGTON sur la nitrification, constate comme ceux-ci qu'une dénitrification complète des nitrates préexistants précède toujours toute nitrification. Il attribue cette dénitrification à une grosse bactérie qui, d'après la description qu'il en donne, semble n'être que le *Bacterium denitrificans* de GAYON et DUPETIT.

Il constate en outre que certains corps, tels que l'acétate de sodium, le phénol, l'acide salicylique, ajoutés à ces milieux, provoquent une nouvelle dénitrification après que la nitrification a commencé. Celle-ci s'arrête alors et ne peut reprendre que lorsque la dénitrification cesse.

MUNRO, confirmant ainsi l'opinion émise auparavant par DUCLAUX (12), conclut que les bactéries de la dénitrification peuvent vivre à côté des bactéries de la nitrification, mais que les unes sont très résistantes et très actives tandis que les autres sont facilement détruites et n'agissent qu'avec une extrême lenteur. Le *Bacterium denitrificans* de GAYON et DUPETIT, observé par MUNRO, a un pouvoir réducteur particulièrement intense qui s'étend, non seulement aux nitrates qu'il réduit en azote, mais encore aux sulfates qu'il réduit en sulfures, et d'après MÜNTZ (33)

aux chlorates, aux bromates, aux iodates qu'il réduit en chlorites, en bromites, en iodites lorsqu'on le place en présence de terre arable humide.

FRANKLAND (14) isola de l'air et de l'eau toute une série de germes qu'il cultiva dans le but d'étudier leur aptitude à la dénitrification, et il remarqua qu'au bout de quarante et un jours, aucune de ces bactéries n'était parvenue à réduire complètement le nitrate primitif. D'après lui, la somme de l'azote nitreux et de l'azote nitrique, à la fin de l'expérience, était presque exactement égale à l'azote nitrique de la solution originale; il en conclut donc que la petite quantité d'ammoniaque retrouvée à la fin de l'expérience provenait de la peptone sur laquelle les microbes étaient cultivés. Il institua une série d'essais dans lesquels la quantité de peptone et de sucre était variée, et il nota que la rapidité de décomposition des nitrates était en rapport avec les proportions de peptone et de sucre contenues dans la solution primitive.

FRANKLAND fait remarquer enfin que la propriété de réduire les nitrates en nitrites a été constatée par lui *seulement chez des bacilles et jamais chez des microcoques*.

Pendant ce temps, d'autres recherches se poursuivaient un peu partout, non plus seulement sur la dénitrification, au point de vue scientifique, mais encore et surtout au point de vue de l'agriculture.

Ainsi, en 1888, SPRINGER (44) observe dans le jus de tabac un microbe capable de détruire non seulement les nitrates existant dans le tabac, mais encore ceux qu'on y ajoutait. Dans le même ordre d'études, nous pourrions encore citer les travaux de REISET (33), de DEHÉRAIN (11), de WAGNER (55) et de WARINGTON (54), dont les recherches portèrent sur un grand nombre de microbes.

TACKE (49) en étudiant la transformation de diverses substances sous l'influence de la putréfaction obtenue par l'ensemencement avec des débris de terre, de boue ou de fromage pourri, a constaté qu'en l'absence des nitrates, les matières organiques azotées sont décomposées avec dégagement de CO_2 , d'hydrogène ou d'hydrogène sulfuré et de formène, mais qu'il ne se dégage pas d'azote, que l'on ait opéré en présence de l'oxygène ou en son absence. Si, au contraire, la putréfaction a lieu *en présence des nitrates* et à l'abri de l'air, il se produit une dénitrification énergique accompagnée de production d'azote et d'oxydes inférieurs de l'azote. En

présence de l'air, ces phénomènes sont moins accentués, mais se produisent quand même. Partant de ces observations, l'auteur se demande si la destruction des nitrates n'est pas produite indirectement sous l'action de l'hydrogène naissant. Il faut remarquer toutefois que les microbes décrits par GAYON et DUPETIT ne dégagent pas d'hydrogène et réduisent cependant les nitrates.

Nous citerons sans nous y arrêter les travaux de BRÉAL (6) sur la destruction des nitrates dans l'eau où avait macéré de la paille. Il constate que cette destruction est l'œuvre d'un ferment, puisque la chaleur ou les antiseptiques l'arrêtent, et qu'elle peut se produire même en présence de l'air.

Le travail publié en 1892 par GILTAY et ABERSON (20) présente au contraire un intérêt de premier ordre. Il contient l'étude complète d'une bactérie dénitrifiante, le *Bacillus denitrificans*, isolée de l'air et du sol de l'École d'agriculture de Wageningen. Ce bacille est très voisin du *Bacillus denitrificans* (α et β) de GAYON et DUPETIT, et n'en différerait que par certaines particularités morphologiques.

Le milieu employé par les auteurs était un liquide artificiel comportant différents sels, plus 2 grammes de nitrate de potasse et 1 gramme d'asparagine par litre. Dans d'autres expériences, l'asparagine fut remplacée par 2 grammes de glucose, afin de faire disparaître du milieu toute substance azotée autre que le nitrate. A la fin de l'expérience, tout l'azote avait été dégagé, et il ne restait plus d'azotate ni d'azotite. Les gaz étaient constitués par de l'azote, de l'acide carbonique et de l'oxygène. Il est bon de constater qu'il ne se dégagait ni hydrogène, ni oxydes inférieurs de l'azote.

Dans le milieu nutritif contenant de l'asparagine, on constatait, après culture, la présence d'une certaine quantité d'ammoniaque, et le volume d'azote dégagé était presque toujours supérieur à celui que pouvait dégager le nitrate. Une partie de ce gaz provenait donc de l'asparagine. Le fait est à remarquer, nous en aurons l'explication tout à l'heure.

Dans le milieu à base de glucose, il ne se formait pas d'ammoniaque et le volume d'azote dégagé correspondait sensiblement avec le volume d'azote que pouvait dégager le nitrate.

En 1885, BURRI et STUTZER (8), dans le but de caractériser les organismes dénitrifiants signalés par WAGNER dans le fumier et par BRÉAL dans la paille, instituent une série d'expériences qui les

amènent à isoler du fumier d'abord deux bactéries qui, cultivées séparément en bouillon nitraté, sont incapables de détruire les nitrates, mais qui, cultivées ensemble, provoquent à la surface du liquide une mousse blanche caractéristique d'une fermentation intense; de plus, après trente heures, toute trace de nitrate ou de nitrite avait disparu. La destruction était donc complète.

Ils en conclurent donc que ces deux microorganismes ne sont pas dénitrifiants isolément, mais qu'ils le deviennent lorsqu'ils vivent en symbiose. Ils se partageraient donc le travail de la dénitrification.

Le premier de ces germes fut identifié avec le *Bacterium Coli commune*; le second fut désigné sous le nom de *Bacterium denitrificans I*.

BURRI et STUTZER expliquent l'action symbiotique de ces deux bactéries par ce fait que le *B. Coli* transformerait le nitrate en nitrite sans aller plus loin et que le *B. denitrificans I*, incapable d'attaquer le nitrate, décomposerait au contraire le nitrite en ses éléments.

Cette théorie fut admise plus tard par HUGO WEISSEMBERG (1898), mais nous ferons remarquer que le *B. Coli* est parfaitement capable de décomposer les nitrates à lui tout seul avec dégagement gazeux quand on lui fournit un milieu convenable, du simple bouillon de viande, par exemple, ainsi que l'a démontré GRIMBERT en 1898, et que, par conséquent, en admettant qu'il y ait symbiose, il pourrait se faire que les rôles fussent intervertis et que ce fut le *B. denitrificans I* qui préparât le milieu au *B. Coli*.

De la paille de blé, les mêmes auteurs isolèrent une autre bactérie dénitrifiante, le *Bacterium denitrificans II*, qui possède le pouvoir de détruire des quantités élevées de nitrates et de nitrites en dégageant de l'azote libre.

Ils constatèrent, comme GAYON et DUPETIT, que, d'une part, en l'absence de l'air, le *Bacterium denitrificans II* détruit normalement le nitrate, tandis qu'en présence de l'air la destruction est nulle ou presque nulle; d'autre part, que, en l'absence de l'air, la symbiose *Coli* + *Denitrificans I* ne dégage pas d'azote libre dans un milieu nitraté; le *Bacterium Coli* agissant seul pour transformer les nitrates en nitrites; tandis qu'en présence de l'air le *Bacterium denitrificans I* peut se développer suffisamment pour détruire le nitrite formé par le *Bacterium Coli*. Lorsqu'on

fait passer dans le milieu une grande quantité d'air au moyen d'une trompe la fermentation est arrêtée.

BURRI et STUTZER concluent que la destruction du nitrate par les bactéries dénitrifiantes n'est que la conséquence d'un travail de réduction énergétique.

A partir de ce moment, le nombre des espèces dénitrifiantes nouvelles isolées, décrites et baptisées, s'augmente rapidement. Nous citerons les travaux de EGUNOW (43), BRÉAL (7), SCHIROKIKH (38), AMPOLA et GARINO (1), sans nous y arrêter, car nous pensons qu'il est utile de rappeler seulement les recherches présentant un intérêt particulier au sujet du mécanisme de la dénitrification.

SEWERIN (43) démontra (1895-1897) que lorsque, dans les expériences de dénitrification, on trouve des germes qui réduisent les nitrates seulement en nitrites, ceux-ci peuvent toujours être détruits à leur tour si la solution est suffisamment étendue. Il opérait de la façon suivante : les bouillons de peptone nitrés étaientensemencés avec le germe à étudier et placés pendant dix jours à 30°C., la proportion de nitrate était modifiée suivant les circonstances. Dans ces conditions, les deux microbes les plus énergiques (*B. pyocyaneus* et *Vibrio denitrificans*), appelés d'abord Bacilles n° 3, dénitrifiaient un bouillon contenant 3 ‰ de nitrate de soude et même jusqu'à 6 ‰; les deux suivants (Bacilles n° 4) pouvaient dénitrifier un bouillon nitré à 2 ‰ et le Bacille n° 6 (variété *Subtilis*), un bouillon à 1 ‰; quatre autres microorganismes non désignés, ne dénitrifiant que le bouillon nitré à 0,5 ‰, et les trois derniers, des bouillons encore plus faibles.

SEWERIN constata enfin que cette destruction du nitrate cessait sous l'action d'un courant d'air énergétique. Il conclut en disant que l'azote des nitrates est en grande partie éliminé à l'état libre ou mélangé de composés oxygénés de l'azote, le reste se transformant en azote organique, et une très faible partie passant à l'état d'ammoniaque. Dans tous les cas le bouillon doit être assez riche en aliment carboné pour former avec l'oxygène du nitrate, de l'acide carbonique, lequel vient se substituer à l'azote nitrique éliminé en donnant des carbonates alcalins.

Ayant constaté que beaucoup d'expériences sur les propriétés dénitrifiantes des bactéries contenues dans la paille et dans les excréments de divers animaux, avaient fourni à leurs auteurs

des résultats variés et même contradictoires, JENSEN (de Copenhague) (24) émit l'opinion qu'il pouvait exister un rapport entre l'action des bactéries dénitrifiantes et la quantité de carbone organique mise à leur disposition, ce qui pourrait expliquer la divergence des résultats.

Il utilisa pour ses expériences trois espèces de bactéries dénitrifiantes dont deux furent isolées d'une culture ancienne sur bouillon et la troisième retirée de la bouse de vache. Ces bactéries détruisaient les nitrates directement, comme le *Bacterium denitrificans* II de STUTZER, sans intervention symbiotique d'aucune autre bactérie.

Il ensemença avec ces bactéries d'abord du bouillon de peptone nitré à 0,3 %, puis la solution n° 2 de GILTAY et ABERSON¹, et il remarqua que, dans la première solution, tout le nitrate était détruit en vingt-quatre heures, tandis que, dans le second milieu, il fallait quatre jours pour obtenir une destruction complète. Et il attribua cette différence à ce fait que le premier milieu contenait des composés fort complexes, tandis que le second ne contenait comme composés organiques que du glucose et de l'acide citrique.

Voulant déterminer lequel de ces deux corps jouait le rôle le plus actif, il établit une série d'expériences qui lui permirent de constater que l'acide citrique, en combinaison sodique ou potassique, suffisait à fournir aux bactéries tout le carbone nécessaire à leur développement, tandis que le glucose, loin de jouer un rôle actif, pouvait même retarder le développement des bacilles. Il remarqua cependant que la quantité de glucose diminuait progressivement au cours de la fermentation, et même que la quantité de nitrate détruit augmentait parallèlement avec l'augmentation du glucose.

La glycérine et l'amidon se comportent comme le glucose, à condition toutefois que le milieu contienne de l'acide citrique, de

1. Solution n° 2 de GILTAY et ABERSON :

Nitrate de potasse	2gr
Glucose	2gr
SO ⁴ Mg	2gr
Acide citrique	5gr
Monophosphate de K	2gr
Chlorure de calcium	0gr20
Perchlorure de fer	II gouttes.
Eau distillée	1.000gr

l'acide butyrique ou de l'acide lactique; l'acide formique ne pouvant remplacer en aucun cas ces derniers composés.

Il continua alors la série de ses expériences, mais au lieu de partir de cultures pures, il employa de la terre arable, du fumier de cheval, de la bouse de vache et de la paille : ainsi la glycérine pouvait être utilisée directement comme source de carbone. En réalité, celle-ci subissait l'action destructive des bactéries de la putréfaction qui la détruisaient en donnant de l'acide butyrique et divers autres acides gras, et c'étaient ces derniers corps qui intervenaient, et non la glycérine elle-même.

De ces expériences, JENSEN conclut qu'on peut distinguer plusieurs sortes d'aliments carbonés susceptibles de favoriser la dénitrification : d'une part, les composés directement assimilables, tels que les acides butyrique, lactique, citrique, et d'autre part les composés difficilement assimilables, tels que la glycérine, le glucose et l'amidon, ces derniers ne pouvant être utilisés qu'après décomposition par les bactéries de la putréfaction ou lorsque les bactéries de la dénitrification ont acquis une énergie suffisante pour pouvoir les utiliser.

La conclusion du travail de JENSEN est que les bactéries dénitrifiantes existent partout, dans le fumier, dans la terre, sur la paille, dans l'air, mais qu'elles ne peuvent manifester leur fonction que si elles trouvent à leur disposition à la fois du salpêtre et des composés carbonés directement assimilables, en quantité suffisante.

HUGO WEISSEMBERG (56), cherchant à se faire une idée nette du travail effectué par les bactéries dénitrifiantes agissant seules ou en symbiose, s'adressa aux bactéries de BURRI et STUTZER : le *Bacterium vulgare* (*Proteus* de HANSEN) et le *B. pyocyaneus*. Il obtint les résultats suivants qui ne sont que la confirmation de travaux antérieurs, mais qui ont l'avantage sur ceux-ci de les résumer clairement :

1° Certaines bactéries qu'il appelle les bactéries dénitrifiantes vraies ont le pouvoir, lorsqu'elles manquent d'oxygène, d'emprunter celui-ci au nitrate de soude. Et en effet, l'arrivée d'une quantité suffisante d'oxygène arrête toute dénitrification, et sa suppression a pour conséquence la reprise immédiate du travail de dénitrification;

2° Par suite de cette destruction, l'azote du nitrate se dégage à l'état libre, et la base mise en liberté donne au milieu une alcalinité telle que le microbe cesse de se développer;

3° C'est donc au non développement des bactéries qu'il faut attribuer la fin de la destruction du nitrate et non à un pouvoir spécial des acides ou des bases ;

4° Quelques bactéries qui ne détruisent le nitrate que lorsqu'elles vivent en symbiose, opèrent suivant un mode tout différent : l'une d'elles réduit d'abord le nitrate en nitrite, puis l'autre intervient pour décomposer le nitrite en ses éléments avec dégagement d'azote. C'est la confirmation de la théorie de BURRI et STUTZER sur le rôle de la symbiose *Bacterium coli* ou *Bacillus typhosus* et *Bacterium denitrificans* I ;

5° La transformation du nitrate en nitrite par les bactéries vivant en symbiose ne semble pas être la conséquence d'un prélèvement direct d'oxygène au nitrate par les cellules des bactéries, car elles sont aérobies, et ne peuvent se développer qu'en présence de l'air.

A la même époque se place un important mémoire de GRIMBERT (21) sur le *Bacterium coli* et le *Bacillus typhosus* au point de vue de leur fonction dénitrifiante.

Il cultiva ces deux microbes sur différents milieux :

1° Sur l'eau peptonée à 1 % renfermant 1 % de *nitrate* ; dans ces conditions, il se produisit une transformation partielle du nitrate en nitrite, mais il n'y eut aucun dégagement gazeux ;

2° Sur le bouillon de bœuf peptoné à 1 % et nitraté à 1 %, il remarqua un abondant dégagement gazeux. Considérant qu'un tel changement dans les fonctions biologiques des microbes étudiés, résultant de la substitution d'un milieu à un autre, était un fait biologique assez important, il détermina : α) la nature des gaz recueillis ; β) la proportion d'azotate détruit ; γ) le rapport entre cette quantité et le volume d'azote dégagé ; δ) la proportion de nitrites restant en solution après l'action des microbes ; ϵ) le volume d'azote amidé fourni par les 125 cm³ du bouillon avant tout ensemencement.

Et afin de mieux faire ressortir, au point de vue de leur action sur les nitrates, la différence qui existe entre ces bacilles et les ferments dénitrifiants vrais, il s'adressa à un agent énergique de dénitrification, le *Bacille pyrocyanique*, qu'il ensemença parallèlement dans une solution de peptone nitratée.

Etant donné l'intérêt que présentent ces expériences au point de vue de la compréhension de notre travail, nous croyons utile de reproduire *in extenso* les résultats obtenus par GRIMBERT.

Il trouva qu'après trente-quatre jours de séjour à l'étuve à + 37°, tout dégagement gazeux avait cessé dans les cultures.

	B. coli.	B. d'Éberth.	B. pyocyanique.
Réaction.	Neutre.	Neutre.	Très alcaline.
Gaz total.	39 ^c 13	36 ^c 07	100 ^c 48
Azote	28 ^c 09	25 ^c 96	100 ^c 48
CO ²	11 ^c 04	10 ^c 40	0
Azotate détruit.	0 ^{sr} 112	0 ^{sr} 118	0 ^{sr} 910
Soit.	8,90 %	9,40 %	72,80 %
Azotite restant	0 ^{sr} 289	0 ^{sr} 261	0 ^{sr} 136
Soit.	23,10 %	20,80 %	10,88 %

Si nous calculons à quel volume d'azote correspond la quantité de nitrate consommée, et si nous comparons ces deux données au volume d'azote amidé capable d'être fourni par les milieux de culture, nous obtenons les chiffres suivants :

	B. coli.	B. d'Éberth.	B. pyocyanique.
Azote dégagé.	28 ^c 09	25 ^c 96	100 ^c 48
Azote du nitrate détruit	12 ^c 34	13 ^c 00	100 ^c 41
Azote amidé	47 ^c 12	47 ^c 12	13 ^c 80

La différence entre ces deux catégories de microbes est donc frappante.

Il est à remarquer que le B. pyocyanique ne donne que de l'azote, sans aucune trace d'acide carbonique. Et cependant il s'en forme par suite de la combustion du carbone de la matière organique par l'oxygène du nitrate décomposé, mais il ne peut se dégager, car la base du nitrate devenue libre l'absorbe en totalité, en donnant du bicarbonate de potasse qui communique au milieu une réaction fortement alcaline.

Enfin le volume d'azote dégagé est exactement le même que celui qui provient du nitrate détruit et il est plus de sept fois supérieur à celui qui pourrait être fourni par les principes amidés du bouillon.

Dans le cas du B. Coli et du B. d'EBERTH, la réaction reste neutre jusqu'à la fin et le dégagement gazeux est formé à la fois d'acide carbonique et d'azote.

De plus le volume d'azote recueilli est sensiblement le double de celui qui correspond au nitrate détruit, et la moitié seulement de celui qui serait dégagé par l'hypobromite. Et GRIMBERT admet que la moitié seulement de l'azote dégagé provient des nitrates; l'autre moitié ne pouvant provenir que des principes amidés du

bouillon. Ces substances ayant été décomposées par les produits de réduction du nitrate par les bactéries, entre autres par l'acide nitreux.

Il est donc évident que le *B. Coli* et le *B. d'EBERTH* n'attaquent pas les nitrates de la même façon que le *B. pyocyanique*.

Partant de ce principe que la réduction des nitrates par le *Coli* et l'*EBERTH* est due aux substances amidées, GRIMBERT pensa qu'en fournissant à la solution de peptone l'azote amidé qui lui manque, on obtiendrait un dégagement d'azote. Aussi institua-t-il un nouveau milieu ;

3° Solution de peptone à 1 % nitratée à 1 %, additionnée d'extrait de viande dans la proportion de 1 %. L'extrait de viande renferme tous les principes contenus dans le bouillon, mais il est un fort mauvais milieu de culture par lui-même ; il n'est donc pas possible d'invoquer ses qualités nutritives pour expliquer les différences d'activité constatées dans la fermentation.

Les milieux institués par GRIMBERT pour ces expériences sont de trois sortes : 1° solution de peptone à 1 % ; 2° solution d'extrait de viande à 1 % sans peptone ; 3° solution d'extrait de viande à 1 % additionnée de 1 % de peptone.

Le bacille dénitrifiant employé était le *B. Coli*.

Réaction.	Peptone à 1 %	Extrait de viande à 1 %.	
		Sans peptone.	Avec 1 % de peptone.
	Faiblement acide.	Faiblement alcaline.	Neutre.
Gaz total.	0	9 ^c 09	32 ^c 78
Azote	0	7 ^c 01	23 ^c 45
CO ²	0	2 ^c 08	9 ^c 33
Azotate détruit.	0	0 ^{sr} 027	0 ^{sr} 055
Soit	0	2,16 %	4,40 %
Azotite restant	0 ^{sr} 05	0 ^{sr} 408	0 ^{sr} 220
Soit	4 %	32,64 %	17,60 %
Azote dégagé	0	7 ^c 01	23 ^c 45
Azote de l'azotate détruit. .	0	2 ^c 90	6 ^c 03

Ici encore le volume de l'azote recueilli est bien supérieur à celui qui correspond à l'azotate détruit.

La peptone, en rendant le milieu plus nutritif, a apporté à la semence la source d'énergie nécessaire à sa fonction, tandis que l'extrait de viande fournit au milieu les matières amidées indispensables à la décomposition du nitrate.

Le fait est d'ailleurs confirmé par de nouvelles expériences

faites avec des quantités croissantes d'extrait de viande dans lesquelles la proportion d'azotate détruit augmente parallèlement avec les poids d'extrait ajoutés au milieu. Les chiffres suivants sont d'ailleurs assez explicites :

	B. coli.		B. d'Éberth.	
	1 %	2 %	1 %	2 %
Extrait de viande	Neutre.	Alcaline.	Faiblem. acide.	Faiblem. alcaline.
Réaction.				
Gaz total.	32 ^c 78	44 ^c 83	16 ^c 48	31 ^c 36
Azote.	23 ^c 45	31 ^c 82	14 ^c 34	26 ^c 25
CO ²	9 ^c 33	13 ^c 01	2 ^c 14	4 ^c 71
Azotate détruit	0 ^{sr} 055	0 ^{sr} 140	0 ^{sr} 059	0 ^{sr} 118
Soit.	4,40 %	11,20 %	4,72 %	9,44 %
Azotite restant	0 ^{sr} 220	0 ^{sr} 358	0 ^{sr} 142	0 ^{sr} 313
Soit.	17,6 %	28,64 %	11,36 %	25,04 %
Azote dégagé.	23 ^c 45	31 ^c 82	14 ^c 34	26 ^c 25
Azote de l'azotate détruit.	6 ^c 05	15 ^c 44	6 ^c 45	13 ^c 00

Enfin la solution de peptone semble contenir aussi des substances capables de réagir sur l'acide nitreux, mais probablement en faible quantité, car, ainsi que l'a fait remarquer GRIMBERT, la quantité d'azote dégagé par l'hypobromite n'est pas nécessairement égale à celle que donnerait l'acide nitreux ;

4° GRIMBERT institua en effet un quatrième milieu composé exclusivement d'eau peptonée nitratée à 1 %, mais dans laquelle la proportion de peptone est élevée à 5 %. Si la peptone renferme réellement de l'azote amidé, et si c'est bien ce dernier qui entre en réaction, nous devrons trouver entre l'azote recueilli et celui du nitrate détruit, la même disproportion que dans les expériences précédentes.

C'est ce que les chiffres recueillis au cours des expériences nous prouvent éloquemment :

	B. coli.	B. d'Éberth.
	Faiblement acide.	Faiblement acide.
Réaction		
Gaz total.	19 ^c 75	13 ^c 43
Azote.	16 ^c 29	11 ^c 29
CO ²	3 ^c 46	2 ^c 14
Azotate détruit	0 ^{sr} 079	0 ^{sr} 027
Soit.	6,32 %	2,10 %
Azotite restant	0 ^{sr} 050	0 ^{sr} 024
Soit.	4 %	1,92 %
Azote dégagé.	16 ^c 29	11 ^c 29
Azote de l'azotate détruit. . .	8 ^c 70	2 ^c 90

Enfin certains auteurs ayant prétendu que la présence de

nitrites était susceptible d'arrêter le pouvoir fermentatif des bacilles d'ESCHERICH et d'EBERTH à cause de leur toxicité, GRIMBERT cultiva sur des milieux formés de 1 % de peptone, 1 % d'extrait de viande et 1 % de *nitrite* de potasse, les B. Coli et d'EBERTH, et il constata que ces deux bactéries, non seulement se développaient très bien, mais encore dégageaient des quantités d'azote supérieures à celles qu'elles avaient dégagées précédemment dans des milieux ne renfermant que du nitrate.

La toxicité du nitrite de potasse pour ces bacilles est donc absolument nulle.

En résumé, GRIMBERT propose de diviser les bactéries dénitrifiantes en deux catégories :

D'une part (B. pyocyanique), les bactéries attaquant directement le nitrate dont elles utilisent l'oxygène pour brûler le carbone, et fixant l'acide carbonique sur la base du nitrate devenue libre ; d'autre part (B. Coli), les bactéries réduisant le nitrate en nitrite, réduction se complétant par l'action secondaire entre le nitrite et les matériaux amidés apportés par le milieu de culture.

Cette réaction semble résulter de l'action secondaire qu'exerce sur ces substances l'*acide nitreux* formé par les bactéries (elle est analogue à l'action de l'acide nitreux sur l'urée), et peut être représentée par l'équation suivante :



Cette réaction se produisant sans doute grâce à l'intervention d'un acide formé aux dépens de certaines substances du bouillon, acide qui sature la base au fur et à mesure qu'elle devient libre, d'où neutralité du milieu.

Aussi GRIMBERT propose-t-il de désigner sous le nom de *ferments dénitrifiants vrais* ceux qui, comme le B. pyocyanique, dégagent l'azote des nitrates en solution peptonée à 1 %, et réserve-t-il la dénomination de *ferments dénitrifiants indirects* à ceux qui ne produisent de résultat qu'en présence des acides amidés du bouillon.

La suite de ce travail montrera suffisamment pourquoi nous avons si longuement insisté sur ces expériences.

En 1898, JENSEN (25) publie un important mémoire dans lequel il cherche à condenser les notions connues sur la dénitrification ; il y dresse la liste des bactéries dénitrifiantes connues, ne comprenant sous cette dénomination que celles qui, en cultures pures,

peuvent détruire le salpêtre en dégageant de l'azote libre, à l'exclusion de celles qui sont susceptibles de former avec ce même salpêtre des composés azotés organiques tels que les matières albuminoïdes, ou inorganiques comme les nitrites et les sels ammoniacaux.

La dénitrification semble due à une fixation d'oxygène par les bactéries dénitrifiantes ; et comme celles-ci ne peuvent vivre en l'absence de l'air, elles ne peuvent se développer dans le bouillon nitré et à l'abri de l'air, qu'en détruisant le salpêtre pour prendre son oxygène. Il dit donc que la dénitrification est une respiration intramoléculaire inorganique.

Suit une longue classification des bactéries dénitrifiantes connues à cette époque.

La définition qu'il donne des ferments dénitrifiants vrais n'est, en somme, que celle donnée déjà par GRIMBERT, avec cette distinction, toutefois, qu'en disant, en culture pure, JENSEN laisse la porte ouverte à un grand nombre de ferments dénitrifiants indirects (B. COLI, B. TYPHIQUE, B. DE FRIEDLANDER) qui, eux aussi, dégagent de l'azote pourvu que le milieu où on les cultive soit du bouillon de viande.

SCHNEIDEWIND (42), étudiant la décomposition du salpêtre par les microbes contenus dans le fumier et dans la paille, dit que la condition fondamentale pour la décomposition du salpêtre est l'existence de sources de carbone appropriées, telles que la cellulose, l'amidon, la mannite, le sucre de raisin, la glycérine, les acides lactique, butyrique et citrique.

AMPOLA et ULPANI (2) furent amenés par des recherches chimiques sur le mécanisme de la dénitrification à l'aide de deux bactéries qu'ils désignent sous les noms de *Bacterium denitrificans* V et *Bacterium denitrificans* VI, à conclure que, dans la nature, il doit se former des nitrites et de l'ammoniaque, puis du nitrite d'ammoniaque décomposable en azote pur par les bactéries déshydratantes. Cette théorie explique bien la formation d'azote mais elle reste muette sur la formation, pourtant bien établie, d'acide carbonique.

MARPMANN (30), de Leipzig, déclare que, contrairement à ce que l'on admet généralement, les bactéries réductrices ne peuvent désagréger un composé nitré en donnant comme résultat de l'azote libre. Les observations montrent que ces bactéries dégagent de l'hydrogène élémentaire, et que cet hydrogène doit

donner, comme résultat final, des combinaisons simples telles que H^2O , H^2S , AzH^3 , et non de l'azote élémentaire. Dans le milieu où elles vivent, elles produisent de l'hydrogène qui, agissant comme réducteur sur les nitrates, les transforme en nitrites et en sels ammoniacaux en même temps qu'il se produit, aux dépens des matières albuminoïdes de la culture, des amines et des amides. C'est l'action secondaire des nitrites sur les sels ammoniacaux et les amides qui dégage de l'azote libre. Cette réaction ne peut se produire qu'en milieu acide, jamais, ou difficilement, dans les liquides alcalins.

Cette théorie semble se rapprocher de celle que GRIMBERT applique aux ferments dénitrifiants indirects (avec cette différence qu'elle n'explique pas la formation de CO^2), mais elle est complètement en désaccord avec les faits quand il s'agit de ferments directs.

En effet, le Bacille pyocyanique dégage de l'azote pur dans un milieu qui reste toujours fortement alcalin. Ensuite, si, malgré cela, la théorie de MARPMANN était exacte, on devrait toujours trouver, quelle que soit la bactérie, un volume d'azote au moins double de celui qui correspond au nitrate détruit, puisque cet azote proviendrait à la fois du nitrite et des amides formés, l'un de la réduction du nitrate, les autres aux dépens des matières albuminoïdes du milieu de culture.

Or, il n'en est rien, et GRIMBERT a démontré que le Bacille pyocyanique fournit un volume d'azote exactement correspondant à celui du nitrate consommé.

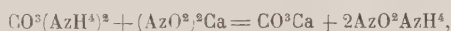
La théorie de MARPMANN pourrait peut-être être reprise sous une autre forme. Un bacille dénitrifiant vrai réduirait les nitrates en nitrites et en sels ammoniacaux, et l'intervention d'un acide produit par la bactérie aux dépens du milieu nutritif provoquerait la décomposition réciproque de ces deux sels. De cette façon, l'azote dégagé serait toujours fourni exclusivement par le nitrate.

Mais alors, d'où proviendrait l'acide carbonique qui, dans le cas du B. pyocyanique, sature la base du nitrate? Cette objection suffirait, je crois, à ruiner la théorie de MARPMANN, plutôt que l'objection tirée de l'alcalinité du milieu. Car un acide peut agir, en tant qu'acide, dans un milieu alcalin, pour amener la décomposition d'un nitrite en présence d'amides, sans que le milieu cesse de conserver sa réaction alcaline. L'expérience suivante de GRIMBERT le démontre aisément :

Dans une cloche à robinet remplie de mercure, introduisons successivement une solution de nitrite de potasse à 1 % par exemple, puis une solution d'urée, et enfin un grand excès de lessive de soude pure, colorons le tout par de la phtaléine, et faisons arriver dans le mélange, par très petites portions à la fois, de l'acide sulfurique étendu, en quantité insuffisante pour saturer la soude. A chaque addition d'acide, un dégagement d'azote a lieu, et cependant le milieu reste fortement alcalin. En effet, chaque goutte d'acide, au moment où elle arrive dans la solution alcaline, se trouve, au point où elle tombe, en excès pendant un temps très court, mais suffisant pour agir sur le nitrite. Il en résulte la mise en liberté d'acide nitreux qui réagit sur l'urée pour donner de l'azote et de l'acide carbonique; ce dernier est absorbé par la soude et l'azote seul se dégage.

WOLF (59) remplaça les nitrates alcalins par du nitrate de chaux pur, lequel est soluble dans l'eau peptonée, et il remarqua que ce sel est détruit par le *B. pyocyaneus* et par le *B. fluorescens liquefaciens* avec formation immédiate et continue de carbonate de chaux facile à reconnaître au microscope et caractérisé par son insolubilité.

D'après lui, cette formation de carbonate de chaux proviendrait de ce que ces deux bactéries, comme beaucoup d'autres, produisent de l'acide carbonique et de l'ammoniaque en quantité assez notable, et que la plupart des sels de chaux (et en particulier le nitrite) se transforment en carbonate de chaux en présence des carbonates alcalins, d'après les équations :



puis :



Il admet donc que l'azotate de chaux se transforme en carbonate de chaux et en azote libre, en passant par l'intermédiaire du nitrite de chaux.

On peut alors expliquer la persistance des nitrites en présence d'un fort courant d'air, en remarquant que, dans ce cas, *une grande partie de l'acide carbonique* est entraînée et ne peut agir sur eux; et, en effet, si l'air ainsi entraîné est amené dans de l'eau de baryte, on constate la formation d'un précipité qui dénote la présence d'acide carbonique.

Le pouvoir dénitrifiant serait donc corrélatif du développement de l'acide carbonique : un microbe ne pouvant agir comme dénitrifiant qu'en présence d'un dégagement abondant de ce gaz.

Il (60) confirme ce fait en ajoutant du sucre à une solution peptonée du nitrate,ensemencée avec du *B. coli*, du *B. subtilis*

et du *Mucor mucedo*. Le sucre est attaqué et le nitrite formé par réduction est détruit. Cette destruction est si rapide que lorsque la fermentation est à son maximum, on ne peut déjà plus constater la présence d'acide nitrique ni d'acide nitreux. Ainsi donc, le travail tumultueux de la fermentation alcoolique, avec son abondante production de gaz carbonique libre, a pu détruire les nitrites avec dégagement d'azote libre.

Le fait avait déjà été signalé par JENSEN (26), et il était à prévoir; l'attaque d'un sucre par une bactérie fournit assez d'acides énergiques (acides acétique, lactique, succinique, etc.), pour attaquer un nitrite, et nous ne voyons pas quel rôle l'acide carbonique vient jouer dans la circonstance.

Aussi la conclusion de WOLF, qu'il n'y aurait dénitrification qu'à la condition qu'il y ait en même temps fermentation, doit-elle être ramenée à de plus justes proportions, par exemple à cette interprétation, qu'il n'y aurait dénitrification que là où se rencontrerait en même temps une substance capable de donner un acide par fermentation, et encore cette conclusion ne s'appliquerait guère qu'aux ferments dénitrifiants indirects.

LAURENT (29) admet lui aussi que les bactéries nettement aérobies sont incapables de produire des nitrites aux dépens des nitrates, lorsqu'ils sont en présence de l'air. La destruction des nitrites se ferait grâce à l'intervention de corps auxiliaires, et la présence du carbonate de chaux empêcherait leur disparition.

A cette époque JENSEN (27) prétendit contre STUTZER et HARTLEB (45) que les hydrates de carbone ne peuvent être utilisés directement comme source de carbone par les bactéries dénitrifiantes, leur utilisation ne pouvant avoir lieu qu'en présence de certains sels à acides organiques. Pour lui, si STUTZER et HARTLEB admettent le contraire, c'est qu'au lieu d'utiliser comme lui des milieux de culture renfermant comme unique matière organique du sucre de canne, ils ont pris une solution de peptone additionnée d'extrait de viande : or, ce milieu renferme des substances variées : créatine, créatinine, sarcine, xanthine, acide inosique, carnine, gélatine, acide sarcolactique, qui peuvent avoir une certaine influence sur le développement des bactéries dénitrifiantes; ces matières organiques azotées seraient absolument sans valeur comme source de carbone.

Cet auteur semble ignorer lui aussi le travail publié l'année précédente par GRIMBERT, puisqu'il ne voit dans ces substances

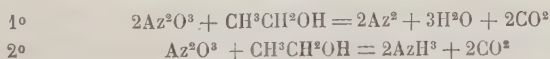
qu'une source possible de carbone, sans soupçonner le rôle chimique qu'elles peuvent jouer par leur réaction sur les nitrites. Ni STUTZER, ni JENSEN ne semblent avoir envisagé ce côté pourtant bien important de la question.

Le fait même que STUTZER employait comme milieu nutritif une solution de peptone additionnée d'extrait de viande, suffit pour ne faire accepter ses résultats qu'avec les plus grandes réserves. Car ce milieu, comme l'a démontré GRIMBERT, l'exposait à prendre pour de véritables bactéries dénitrifiantes des ferments indirects; et de fait, il classe parmi les premiers un *Bacillus Hartlebi* qui, de son propre aveu, ne provoque aucune fermentation dans un milieu nitraté simplement additionné de peptone, mais qui devient actif quand on lui ajoute de l'extrait de viande de LIEBIG. Or, c'est justement là le type des ferments dénitrifiants indirects.

Rien non plus à tirer, au point de vue du mécanisme de la dénitrification, d'une thèse de SALZMANN (37) sur l'action énergétique d'un grand nombre de produits chimiques, sur le *B. Hartlebi* et le *B. Stutzeri*, travail qui est la continuation des recherches de STUTZER.

A la suite de nombreuses expériences faites en vue de l'étude des modifications subies par les nitrates dans le sol, STOKLASA (47) est arrivé à admettre que les microorganismes susceptibles de faire fermenter les nitrates, donnent naissance, comme produits de respiration intramoléculaire, à de l'alcool et de l'acide carbonique, et qu'en général, dans toute fermentation alcoolique (éthylque, butylique, propylique), ayant lieu en présence de nitrate ou de nitrite, il y a mise en liberté d'azote élémentaire.

Suivant les microorganismes employés, on obtiendrait la réduction des nitrates en azote élémentaire ou la réduction des nitrates à l'état d'ammoniaque. La quantité d'azote mis en liberté ou ammonisé dépendant à la fois de l'énergie de la fermentation et des rapports entre les quantités de nitrate existant et d'alcool produit: une molécule d'alcool mise en présence de deux molécules d'acide nitreux donnerait de l'azote élémentaire (fermentation du nitrate), tandis qu'une molécule d'alcool réagissant sur une seule molécule d'acide nitreux, donnerait de l'ammoniaque (ammonisation du nitrate).



L'auteur en conclut que dans la fermentation des nitrates, l'azote mis en liberté se trouve dans un état particulier très actif qui lui permet d'être facilement assimilé par certaines espèces de bactéries, lors même que ces espèces seraient indifférentes à l'azote de l'air, et que ce n'est pas l'azote atmosphérique, mais cet azote libre actif provenant du processus de la dénitrification qui peut être assimilé par certaines bactéries (*B. radicola*).

Il serait peut-être prudent, avant d'admettre une telle théorie, d'attendre qu'elle soit confirmée par d'autres expérimentateurs.

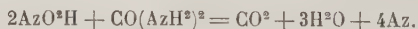
WEISSEMBERG (37), dans un nouveau travail, rappelle l'opinion déjà émise par lui (38) sur la marche de la dénitrification, que les bactéries dénitrifiantes sont susceptibles de décomposer les nitrates pour s'emparer de leur oxygène. Il combat la théorie de WOLF, qui ne voit dans la dénitrification qu'une destruction du salpêtre par l'acide carbonique et l'hydrogène formé dans la décomposition. Il nie la dénitrification vraie en se basant sur ce fait que si l'on cultive des bactéries dénitrifiantes (*B. pyocyaneus*) en présence de l'air, avec ou sans nitrate, la quantité d'oxygène enlevée à l'air est la même dans les deux cas, ainsi que les dosages le prouvent, tandis qu'elle devrait être plus faible ou nulle en présence des nitrates.

WEISSEMBERG ajoute que ce qui entretient le plus le désaccord entre les savants au sujet de la marche de la dénitrification, c'est que les phénomènes sont variables suivant la réaction du milieu nutritif.

Dans une solution nutritive acide, la disparition d'une petite quantité de nitrate peut avoir lieu par transformation en nitrite et mise en liberté d'eau



mais en outre il y a décomposition avec mise en liberté d'azote par l'action sur l'urée, les autres amides et les acides amidés :



Or, ceci n'est possible qu'en liqueur acide, et nous savons que certains microbes ont la propriété de former avec le sucre une quantité plus ou moins grande d'acide, et que beaucoup ont, en outre, le pouvoir de réduire les nitrates en nitrites : il n'est donc pas surprenant que la disparition de ces derniers puisse avoir

lieu par un des modes indiqués pour les milieux à réaction acide.

Mais pour les solutions à réaction alcaline, les bactéries dénitrifiantes vraies possèdent une aptitude spéciale à détruire la molécule des nitrites pour s'emparer de leur oxygène, lorsqu'elles n'en trouvent pas ailleurs, ce qui donne lieu à un dégagement d'azote.

GRIMBERT nous a montré ce qu'il faut penser de cette question d'acidité, car si l'intervention d'un acide semble, dans certains cas, nécessaire, celle-ci peut se manifester même au sein d'un milieu restant neutre ou alcalin.

Ces réserves faites, WEISSEMBERG ne fait que répéter les définitions proposées quatre ans auparavant par GRIMBERT, et qu'il semble n'avoir pas connues.

STOKLASA et VITEK (48) établissent que beaucoup de bactéries dénitrifiantes opèrent parallèlement une ammonisation ou transformation de l'acide azotique en ammoniacque. La réduction est provoquée par la cellule microbienne pour former des matières albuminoïdes aussi bien aux dépens des hydrates de carbone ou des acides organiques que des nitrates.

Les bactéries ammonisantes ne produiraient aucun dégagement d'azote.

Dans leurs expériences, ils ont utilisé comme source d'énergie de l'azotate de soude et comme source de carbone des hydrates de carbone (d- glucose, d- lévulose, d- galactose ou l- arabinose, l- xylose), ou des acides organiques (butyrique, valériannique, lactique, succinique, formique, etc.) ; ces derniers préalablement neutralisés. Un seul de ces corps était introduit dans chaque milieu.

Après culture, le contenu du ballon était analysé au triple point de vue : 1° de l'azote ammoniacal ; 2° de l'azote nitrique ou nitreux ; 3° de l'azote organique.

Ils divisent ainsi les bactéries en *bactéries ammonisantes* et en *bactéries dénitrifiantes*.

Pour les premières, il y aurait transformation de l'azotate, d'abord en azotite, puis en ammoniacque. Ils expliquent ce processus par l'utilisation, par les bactéries, des hydrates de carbone ou des acides organiques au moyen d'une *enzyme respiratoire* qui détruit ces corps jusqu'aux termes hydrogène et acide carbonique libres. L'hydrogène réduit alors le nitrate en nitrite et

celui-ci est ensuite oxydé par l'eau. Par quel moyen? les auteurs omettent de le dire.

Il serait aussi possible qu'il se forme une quantité suffisante d'hydrogène pour réduire le nitrate en ammoniacque par le processus suivant : une molécule d'alcool, produit de la respiration anaérobie, agirait sur une molécule nitreuse pour former de l'ammoniacque d'après la réaction :



Agiraient ainsi les bactéries dénitrifiantes et en particulier le *B. Pyocyaneus*, le *B. Coli*, le *B. d'Eberth* et le *B. Hartlebi*. STOKLASA et VITEK rappellent qu'il est connu que ces microbes transforment pour la plus grande part les nitrates en azote élémentaire et n'en utilisent qu'une faible part pour la constitution de la molécule albuminoïde.

Ils expliquent le fait par l'action d'une molécule d'alcool à l'état naissant provenant de la respiration cellulaire sur deux molécules d'acide nitreux provenant de la réduction de l'acide nitrique :



Leurs conclusions se résument ainsi :

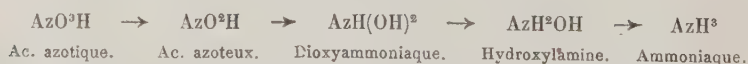
1° Le produit intermédiaire de réduction de l'acide nitrique est l'acide nitreux.

2° La propriété de réduire l'acide nitrique en acide nitreux se rencontre dans tous les microbes étudiés comme dénitrifiants.

3° La réduction de l'acide nitrique en acide nitreux s'opère par le moyen de l'hydrogène naissant.

4° L'hydrogène se forme à côté de l'acide carbonique par la destruction des hydrates de carbone ou des acides organiques au moyen d'une enzyme respiratoire.

Dans un travail très complet et très détaillé, HARTWIG FRANZEN (16) explique ce qu'il faut entendre à son sens par dénitrification : celle-ci serait non pas seulement la réduction du salpêtre en azote libre, mais elle comprendrait aussi toutes les modifications intermédiaires de passage du nitrate au nitrite et ensuite à l'ammoniacque; il imagine même le schéma suivant :



Il suppose la dioxyammoniacque et son anhydride le nitroxyle

AzOH , comme produits intermédiaires qu'on ne trouve pas parce qu'ils sont très peu stables et aussitôt réduits.

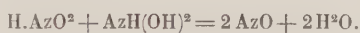
Quant à la formation de l'azote élémentaire, il l'explique ainsi : l'acide azotique n'est pas réduit en totalité en acide nitreux, mais cette décomposition est parallèle avec les autres signalées plus haut, c'est pourquoi on rencontre à la fois tous les produits de décomposition du nitrate dans un même milieu. Il se forme même aussi du nitrite d'ammoniaque que certaines bactéries transforment par voie catalytique en azote et en eau suivant la réaction :



D'autres bactéries conduisent seulement à l'acide azoteux et à l'ammoniaque.

Pour expliquer la formation du protoxyde d'azote, l'auteur admet que certaines bactéries ont la propriété de transformer le nitrite d'hydroxylamine en eau et en protoxyde d'azote, en passant par l'intermédiaire de l'acide hypoazoteux.

Le bioxyde d'azote pourrait également provenir, par une décomposition catalytique, de la dioxyammoniaque et de l'acide nitreux d'après la formule :



En résumé, les quantités d'azote libre, de protoxyde ou de bioxyde d'azote que l'on rencontre dans les produits de la dénitrification, seraient sous la dépendance des propriétés catalytiques des diverses bactéries.

Enfin, dans un tout récent travail, MAZANIELLO CINGOLEANI (9) annonce qu'il a isolé deux germes vivant en symbiose et détruisant la molécule nitrique en donnant d'abord de l'acide nitreux puis de l'azote libre. Les deux microbes isolés par lui et qu'il a appelés *B. porticensis denitrificans* α et *B. port. den.* β se distinguent très nettement par leurs caractères morphologiques et cultureux.

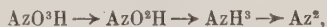
Ses expériences se résument ainsi : si, sur un bouillon nitraté, glucosé ou lactosé, onensemence les deux microbes, il se produit un abondant dégagement de gaz formé en grande partie d'azote, et on ne constate plus après vingt quatre heures ni la réaction de l'acide nitreux, ni celle de l'acide nitrique. Le même bouillon ensemencé avec le *B. port. den.* α seul cultive bien, mais la réaction de l'acide azotique persiste toujours; tandis qu'avec le *B.*

port. den. β seul, on a, après vingt-quatre heures, un abondant dégagement de gaz et la réaction de l'acide nitrique ne tarde pas à faire défaut; mais la réaction de l'acide nitreux persiste. Enfin, le bouillon commun, nitrifié,ensemencé avec le *B. port. den. α* seul, donne une dénitrification excellente, et on n'obtient plus la réaction de l'acide nitreux. Le même liquide nitrifié, traité par le *B. port. den. β* donne toujours la réaction de l'acide nitreux.

Pour obtenir la dénitrification, la présence des deux microbes est donc nécessaire. En outre, l'un d'eux, le *B. port. den. β*, attaque l'acide nitrique en le réduisant en acide nitreux, mais il ne peut aller plus loin, tandis que *B. port. den. α*, dont l'action sur l'acide nitrique paraît nulle, attaque au contraire et détruit l'acide nitreux avec dégagement d'azote libre.

CINGOLEANI signale que dans les cultures du *B. port. den. α* sur eau glucosée ou lactosée, nitrifiée, il a réussi à démontrer dans quelques cas la présence d'ammoniaque. La décomposition de l'acide nitreux en azote libre se ferait donc grâce à la facile décomposition du nitrite d'ammoniaque comme produit intermédiaire.

Pour lui le schéma de la dénitrification serait :



qui est exactement l'inverse de celui de la nitrification.

Il insiste en terminant, sur ce fait que la symbiose signalée par lui du *B. port. den. α* et du *B. port. den. β* est absolument différente par tous ses caractères de la symbiose *B. Coli* et *B. denitrificans* I. de BURRI et STUTZER.

*
* *

En résumé, de tous les travaux que nous venons de rappeler, il résulte que les bactéries dénitrifiantes sont aérobies et ne possèdent la propriété de détruire les nitrates que lorsqu'elles sont privées d'air; alors seulement elles empruntent l'oxygène nécessaire à leur existence à ces composés. C'est ce que GAYON et DUPETIT, puis plus tard WEISSEMBERG, désignent sous le nom de respiration intramoléculaire.

La réduction du nitrate par les bactéries n'est pas une destruction totale immédiate, mais une destruction progressive qui se divise nettement en deux phases; la première va jusqu'à la trans-

formation en nitrite, la deuxième est une désintégration complète du nitrite avec dégagement, entre autres gaz, d'azote élémentaire.

Pour BURRI et STUTZER, le concours de plusieurs bactéries serait nécessaire pour atteindre ce but, les unes allant seulement jusqu'au nitrite, les autres achevant la décomposition. Pour MAZANIELLO CINGOLEANI, cette action symbiotique serait aussi nécessaire.

Pour d'autres, comme MARPMANN, une seule bactérie serait nécessaire, son rôle se bornant à produire de l'hydrogène qui réduirait les nitrates en donnant des nitrites et des sels ammoniacaux qui réagissent sur les amides et les amines formées aux dépens du milieu, pour donner de l'azote libre. Les microorganismes ne seraient donc réducteurs qu'accidentellement : ce serait, non pas une réduction d'origine physiologique, mais d'origine exclusivement chimique.

WOLF admet que les nitrates sont d'abord réduits par l'hydrogène en nitrites, et que ceux-ci sont, à leur tour, détruits par l'acide carbonique provenant de la combustion du carbone alimentaire.

Pour d'autres enfin, et ce sont les plus nombreux, c'est la richesse du milieu en aliment carboné, et la nature de cet aliment qui donnerait aux bacilles leur pouvoir dénitrifiant. GAYON et DUPETIT les premiers, remarquent l'influence d'un milieu nutritif riche en carbone ; ils emploient, entre autres composés, l'asparagine et l'acide citrique. GILTAY et ABERSON, en variant les substances carbonées mises en réaction, constatent des différences très sensibles entre les quantités d'azote dégagées.

Les aliments carbonés peuvent être divisés en catégories suivant qu'ils sont utilisés directement ou après décomposition (JENSEN).

Un auteur beaucoup plus téméraire que ses devanciers, STOKLASA, va même jusqu'à prétendre que l'alcool joue un rôle prépondérant dans la dénitrification. Pour HARTWIG FRANZEN, la dénitrification ne serait pas un phénomène aussi peu compliqué qu'on le supposait jusqu'à présent, les produits intermédiaires formés dans cette opération seraient multiples et c'est par leur réaction réciproque qu'il faudrait expliquer la formation de l'azote élémentaire.

GRIMBERT présente la question d'une façon beaucoup plus nette ; il divise les bacilles dénitrifiants en deux catégories : les

uns, qu'il appelle *bacilles dénitrifiants vrais*, sont capables de détruire les nitrates en présence d'eau peptonée à 1 ‰, ils ont pour type le *B. pyocyaneus*. Les autres (type *Coli* et *Eberth*), qu'il désigne sous le nom de *bacilles dénitrifiants indirects*, sont incapables de détruire les nitrates en eau peptonée, ils ne peuvent le faire qu'en présence des amines et des amides contenues dans le bouillon ou dans l'extrait de viande, qui réagissent, sous l'action des acides, sur les nitrites formés, pour donner de l'azote et de l'acide carbonique.

Il y aurait donc deux espèces de bactéries dénitrifiantes, opérant chacune suivant un processus fort différent.

Semblable est la théorie de WEISSEMBERG qui admet, lui aussi, la décomposition des nitrites par les amides, mais seulement lorsque le milieu est acide. Or, GRIMBERT avait démontré depuis longtemps déjà qu'un acide pouvait parfaitement intervenir comme acide, même en milieu restant fortement alcalin.

L'existence de deux espèces bien délimitées de bacilles dénitrifiants ayant été établie par les travaux de GRIMBERT; d'une part les Bacilles dénitrifiants vrais, d'autre part les Bacilles dénitrifiants indirects, nous nous sommes proposé de rechercher quel était, pour cette dernière catégorie, le processus suivi dans la dénitrification; en d'autres termes, les bactéries n'ayant pas, par elles-mêmes, le pouvoir d'opérer la dénitrification, nous avons cherché quelles sont les substances auxquelles elles s'adressent pour acquérir le pouvoir de décomposer les nitrates jusqu'au terme azote libre.

*
* *

Avant d'entrer dans le détail des expériences que nous avons faites, il nous paraît indispensable de décrire :

- 1° Les appareils employés;
 - 2° Les méthodes de dosages auxquelles nous avons eu recours
-

APPAREILS ET MÉTHODES DE DOSAGES

1° APPAREILS

Comme nous l'avons dit tout à l'heure, la destruction des nitrates par les bactéries dénitrifiantes indirectes ne se fait pas, par définition, dans des milieux quelconques satisfaisant aux conditions de vie végétative des microbes, mais seulement dans certains milieux tels que le bouillon de viande peptoné ou la solution de peptone additionnée d'extrait de viande. Quelles sont les substances entrant dans la composition de ces milieux, dont la présence est nécessaire à la destruction des nitrates? Ce problème ne peut être étudié qu'à la condition de partir de milieux chimiquement définis d'abord, de pouvoir doser ensuite les quantités des éléments constitutants qui restent dans le milieu après que la bactérie y a effectué la dénitrification.

Les appareils utilisés pour de semblables recherches doivent remplir plusieurs conditions :

Ils doivent d'abord avoir une capacité suffisante pour contenir un volume de milieu de culture tel que la destruction de substance qui s'y effectue soit facilement appréciable, les quantités de nitrate mises en jeu étant très faibles et la quantité de substance détruite beaucoup plus faible encore.

Ils doivent en outre permettre de recueillir la totalité des gaz qui se dégagent pendant la durée du séjour à l'étuve.

Nous avons pour cela employé des petits matras d'une capacité de 125 cm³ à col étroit, pouvant être hermétiquement fermés au moyen d'un bouchon de caoutchouc, et portant une tubulure latérale recourbée en S, partant du col, juste au niveau de la base du bouchon, et aboutissant au fond d'un verre à pied plein de mercure, l'extrémité libre de cette tubulure étant recouverte d'un

large tube à essai d'une capacité de 100 cm³ environ. Cette capacité est indispensable si l'on songe que les gaz dégagés pendant une période de quinze à vingt jours, durée moyenne des séjours à l'étuve, atteignent une cinquantaine de centimètres cubes. Ces



tubes, ou pour mieux dire ces cloches, ne devant pas dépasser une vingtaine de centimètres de hauteur pour que les gaz qu'ils contiennent puissent être transvasés dans la pipette à gaz de SALET, sont forcément très larges, et ne pourraient être fermés avec le doigt; aussi avons nous fait établir à l'extrémité libre de ces tubes un étranglement leur laissant une ouverture d'un diamètre ne dépassant pas celui des tubes à essais ordinaires.

Au moment de la stérilisation nos petits matras ont leur col bouché par un tampon de coton, et l'extrémité du tube de dégagement est recouverte d'un dé de caoutchouc; le bouchon de caoutchouc qui doit les fermer après ensemencement, est stérilisé en même temps, car il est porté à l'autoclave, enveloppé dans plusieurs doubles de papier à filtrer.

Enfin, le remplissage définitif du matras se fait au moyen d'une pipette de PASTEUR, portant en son centre une boule d'une capacité suffisante pour contenir un peu plus de liquide qu'il n'est nécessaire pour achever le remplissage du matras à culture, après que l'ensemencement y a été effectué. Ces pipettes sont portées toutes remplies dans l'autoclave, leur extrémité effilée étant fermée à la lampe. De cette façon, toute chance de contamination extérieure est écartée.

Ces précautions sont plus que suffisantes si l'on songe que chaque milieu est ensemencé avec une dose massive (2 à 3 cm³, environ) de culture rajeunie par un séjour de vingt-quatre à quarante-huit heures à l'étuve à + 37°.

2° MÉTHODES DE DOSAGES

Les dosages que nous avons à effectuer sur nos milieux avant et après culture sont :

1° Dosage du nitrate ;

2° Dosage du nitrite.

DOSAGE DU NITRATE

Nous avons effectué nos dosages de nitrates par le procédé de SCHLÆSING, dont le principe est le suivant :

Si dans une solution fraîche de protochlorure de fer contenant un grand excès d'acide chlorhydrique, on fait tomber une solution d'un azotate, ce dernier est décomposé avec mise en liberté de bioxyde d'azote qui se dégage, et d'eau, suivant la réaction :



Sachant qu'une molécule de bioxyde d'azote correspond à une molécule d'azotate, il suffira de mesurer le volume de gaz recueilli pour obtenir, par le calcul, la quantité d'azotate contenue dans un volume connu de la solution.

Nous ne décrivons pas l'appareil employé pour ce dosage, la méthode étant d'un usage trop courant dans les laboratoires pour que nous pensions qu'il soit utile d'insister sur ce point.

Les solutions nécessaires à ce dosage sont :

1° Une solution concentrée de protochlorure de fer ;

2° La solution d'acide chlorhydrique pur des laboratoires ;

3° La solution contenant le nitrate à doser ; cette dernière est constituée par les milieux de culture.

Pour effectuer un dosage, on introduit dans le ballon de l'appareil :

Solution de protochlorure de fer.	50 ^{cc}
Eau distillée	50 ^{cc}
HCl pur	30 ^{cc}

On chasse d'abord l'air contenu dans le ballon, puis on introduit dans ce dernier 10 cm³ du milieu nitraté au moyen d'une ampoule à robinet, et celle-ci est lavée avec quelques centimètres cubes d'acide chlorhydrique pur.

On recommence alors à chauffer pour provoquer la destruction du nitrate, et l'opération est continuée jusqu'à ce que le volume

de gaz contenu dans la cloche cesse d'augmenter; la coloration de la liqueur fournit d'ailleurs des indications assez exactes sur le point de la réaction où l'on se trouve: en effet, la liqueur, d'un vert clair d'abord, devient brun noirâtre à la suite de l'introduction du nitrate, puis cette teinte brune disparaît progressivement pour faire place à la teinte jaune spéciale des solutions étendues de perchlorure de fer. A ce moment, il ne se dégage plus de bioxyde d'azote, il suffit de chauffer encore quelques minutes pour faire passer dans la cloche les traces de bioxyde d'azote encore contenues dans le ballon.

Le contenu de la cloche est alors transvasé avec les précautions d'usage, au moyen de la pipette de SALET, dans une cloche graduée, et le volume est mesuré; la température et la pression sont également notées.

Connaissant le volume de solution nitratée employé, il est facile de calculer la quantité d'acide azotique contenue par litre.

Le volume en est ramené à 0 et 760 d'après la formule :

$$V_0 = \frac{V_t H_t}{(1 + \alpha t) 760}.$$

Supposons que ce volume ainsi corrigé soit de 23 cm³ 3.

Sachant d'autre part que le poids du centimètre cube de bioxyde d'azote pèse 0 gr. 001343, à 0 et 760, nous aurons pour 23 cm³ 3 :

$$0.001343 \times 23,3 = 0^{\text{sr}}0313.$$

Or, d'après la réaction, une molécule d'azotate de potassium correspondant à une molécule de bioxyde d'azote, on peut écrire :

$$1^{\text{gr}} \text{AzO}^{\text{a}}\text{K} = 0^{\text{sr}}297 \text{ de AzO}.$$

On connaîtra le poids d'azotate correspondant à 0 gr. 0313 de AzO en posant l'équation :

$$\frac{x}{0,0313} = \frac{1}{0.297};$$

d'où :

$$x = \frac{0^{\text{sr}}0313}{0,297} = 0^{\text{sr}}105.$$

Nous rapporterons tous nos chiffres à 100 cm³, ce qui nous donne 1 gr. 05 de nitrate de potasse pour 100 cm³ de bouillon.

DOSAGE DU NITRITE

Comme nous opérons sur des milieux très chargés en matières organiques, et presque toujours fortement colorés, nous avons employé la méthode de VIVIER modifiée par GRIMBERT, et employée par lui dans ses dernières expériences. Cette méthode est simple et fort exacte. Elle est fondée sur le principe suivant : lorsqu'on fait réagir l'acide nitreux sur l'urée, on obtient toujours, pourvu que celle-ci soit en excès, un volume d'azote double de celui qui correspond à l'acide nitreux, d'après la réaction :



VIVIER opérait à chaud dans un courant continu d'acide carbonique, ce qui nécessitait l'usage d'un réfrigérant ascendant et d'un appareil à lessive de soude de DUPRÉ.

Or, GRIMBERT a montré qu'on arrivait exactement aux mêmes résultats, en opérant de la manière suivante :

Dans une cloche à gaz à robinet, assez courte pour être maniée facilement sur la cuve à mercure de DOYÈRE, et remplie de mercure, on introduit successivement des volumes égaux des solutions suivantes :

- 1° Milieu renfermant le nitrite à doser ;
- 2° Solution d'urée à 10 % ;
- 3° Acide sulfurique étendu de son volume d'eau.

La réaction est instantanée ; on agite la cloche pour mélanger les solutions, on laisse reposer quelques minutes afin de permettre à la totalité des gaz de se dégager, et on fait passer ceux-ci dans une pipette de SALET, garnie de lessive de soude pour absorber l'acide carbonique.

L'azote restant est transvasé dans une cloche graduée en dixièmes de centimètre cube que l'on porte dans une éprouvette pleine d'eau dont on note la température. Connaissant d'autre part la pression atmosphérique au moment de l'expérience, on réduit le volume à 0 et à 760 mm., et on transforme en poids par le calcul. La moitié de ce poids appartient à l'azote du nitrite ; il suffit alors de multiplier le poids d'azote trouvé par le rapport de l'azote au nitrite de potasse.

Par exemple : Nous partons d'une solution d'azolite de potasse à 0,10 %, et nous en employons 5 cm³.

Ces 5 cm³ dégagent 1 cm³ 8 d'azote à + 15° et 766 mm. Pour connaître le poids de 1 cm³ à 0 et 760 de ce volume d'azote, nous nous reportons aux tables qui donnent :

$$1 \text{ cm}^3 \text{ azote} = 0^{\text{gr}}001174.$$

Il nous suffira de multiplier ce nombre par 1,8 :

$$0,001174 \times 1,8 = 0,00211.$$

Nous avons ainsi le poids d'azote dégagé par 5 cm³ de solution de nitrite, mais comme la moitié de ce poids seulement provient du nitrite, nous pouvons dire que 10 cm³ de solution dégagent 0 gr. 0211 d'azote. Et en multipliant ce chiffre par le rapport de l'azote au nitrite employé, en l'espèce le nitrite de potasse, nous aurons :

$$0^{\text{gr}}0211 \times 6,071 = 0^{\text{gr}}0128,$$

qui représente le poids de nitrite de potasse contenu dans 10 cm³ de solution, ce qui nous donne 0 gr. 128 pour 100 cm³.

Cette méthode a été mise en comparaison par GRIMBERT avec la méthode très précise de dosage du nitrite au moyen du permanganate de potasse, et dans trois expériences dans lesquelles la quantité de nitrite en solution était différente, les résultats obtenus ont été les suivants :

	Par le perman- ganate.	Par le procédé donné.
	milligr.	milligr.
1 ^{re} expérience	79,80	79,70
2 ^e —	46,32	46,20
3 ^e —	43,60	43,65

Le procédé est donc exact; de plus, il n'est influencé ni par la présence des nitrates ni par celle des matières organiques.

III

MILIEUX DE CULTURE ARTIFICIELS EMPLOYÉS POUR L'ÉTUDE DU MÉCANISME DE LA DÉNITRIFICATION PAR LE B. COLI

Nous nous sommes adressé au *Bacterium coli* comme type de bacille dénitrifiant indirect. Ce bacille provenait de l'intestin de l'homme, et a été identifié par nous au moyen de la culture sur gélose tournesolée lactosée, et de la réaction de l'indol. Nous nous sommes assuré de la pureté des cultures en faisant des plaques sur gélatine ; cette opération a d'ailleurs été plusieurs fois renouvelée au cours de ce travail.

Nous avons d'abord répété avec notre microbe les expériences faites par GRIMBERT sur bouillon peptoné, sur peptone et sur extrait de viande¹ afin de nous assurer qu'il possédait bien les mêmes propriétés.

Les résultats obtenus pour chacun des milieux sont réunis dans le tableau suivant :

	Extrait de viande à 1 %			Bouillon peptoné.
	Peptone à 1 %.	Sans peptone.	Peptone à 1 %.	
Réaction.	neutre	faibl. acide.	tr. faibl. ac.	tr. faibl. ac.
Gaz total.	0	6 ^c 30	35 ^c 97	} Gaz perdu.
Azote	0	6 ^c 17	23 ^c 42	
CO ²	0	0 ^c 19	12 ^c 55	
Azotate détruit. .	0	0 ^{sr} 09	0 ^{sr} 14	0 ^{sr} 90
Soit	0	10 %	15 %	11,8 %
Azotite restant. .	0 ^{sr} 040	0 ^{sr} 114	0 ^{sr} 120	0 ^{sr} 127

Ces cultures avaient été maintenues à l'étuve pendant trente jours. Il est bon de remarquer que nous avons obtenu avec ces

1. Voir page 24.

trois milieux une destruction d'azotate bien supérieure à celle qui avait été obtenue par GRIMBERT dans les mêmes conditions ; il n'était arrivé en effet qu'à 2,16 % d'azotate détruit pour le second milieu, à 4,40 pour le troisième et 8,90 pour le quatrième.

Ces chiffres suffisent à nous fixer sur la valeur de notre bacille au point de vue de la dénitrification.

Les milieux employés dans nos expériences sont tous additionnés pour cent de 1 gr. de peptone COLLAS et de 1 gr. de nitrate de potasse. Enfin après y avoir ajouté les produits à essayer nous les avons chaque fois neutralisés avec une quantité convenable soit de bicarbonate de potasse, soit d'une base libre telle que la soude, jusqu'à obtention d'une réaction faiblement alcaline au tournesol. Cette légère alcalinité étant nécessaire au bon développement des cultures.

IV

ACTION DE L'ACIDE CARBONIQUE

SUR LES SOLUTIONS DE NITRITES

Avant d'étudier l'influence des aliments carbonés ou azotés sur le mécanisme de la dénitrification, nous avons voulu vérifier l'exactitude de la théorie de WOLF qui attribue la décomposition des nitrites à l'action de l'acide carbonique développé par la fermentation des matières sucrées existant au sein de la culture.

Pour cela, nous avons fait passer pendant cinq heures consécutives un courant de gaz carbonique pur et sec, d'une part dans une solution titrée de nitrite de soude contenant en même temps 5 % d'urée, d'autre part dans une solution titrée de nitrite de soude seul.

Afin de nous mettre à l'abri des erreurs possibles, nous avons monté un appareil de la façon suivante :

Le courant de CO_2 étant amené dans deux flacons laveurs contenant de l'eau distillée pour arrêter la plus grande partie de l'acide chlorhydrique gazeux entraîné mécaniquement, puis un flacon renfermant une solution de bicarbonate de potasse et un flacon contenant du bicarbonate de soude très légèrement tassé de façon à permettre le passage du gaz; un tube à ponce sulfurique agissant comme dessiccateur; un flacon contenant une solution de nitrite de soude titrée; un tube taré à ponce sulfurique pour indiquer la perte d'eau de la solution titrée; un flacon contenant à la fois une solution de nitrite de soude titrée et de l'urée dans la proportion de 5 %. Enfin un flacon à ponce sulfurique taré pour indiquer la perte d'eau subie par la deuxième solution titrée. L'appareil était terminé par de la lessive de soude destinée à absorber le gaz non utilisé.

Le nitrite de soude a été dosé avant et après passage de l'acide

carbonique par la méthode de VIVIER modifiée par GRIMBERT, indiquée précédemment.

Nous avons obtenu dans des dosages répétés :

1° Pour la solution du nitrite seul :

Avant passage de CO ²	0 ^{sr} 77 de nitrite %
Après — —	0 ^{sr} 77 —
Avant — —	4 ^{sr} 04 —
Après — —	4 ^{sr} 04 —

2° Pour la solution de nitrite de soude et urée :

Avant passage de CO ²	2 ^{sr} 02 de nitrite %
Après — —	2 ^{sr} 02 —

Dans toutes ces solutions la quantité de nitrite de soude est restée intacte malgré un passage d'acide carbonique de plusieurs heures.

Nous concluons donc à l'impossibilité de déplacer l'acide nitreux de ses combinaisons salines au moyen de l'acide carbonique et par conséquent la théorie de WOLF est à rejeter entièrement.

V

INFLUENCE DE L'ALIMENT CARBONÉ

I. — ALIMENT TERNAIRE.

1. — Glycérine et autres composés alcooliques.

D'après la théorie de JENSEN, la destruction du nitrate sous l'action des bactéries aurait un rapport très étroit avec la quantité de carbone organique mise à leur disposition. Le bouillon et l'extrait de viande étant des milieux fort complexes, le choix de l'aliment était très difficile ; aussi, avant de nous adresser à des composés très compliqués et présentant de multiples fonctions, nous avons employé l'un des plus simples de ces composés, la glycérine.

Celle-ci subit en effet plus facilement la fermentation que les premiers termes de la série alcoolique.

Mais à quel milieu fallait-il ajouter cette glycérine ? Il est indispensable avant tout de choisir un milieu aussi simple que possible pour éviter toute objection au sujet des autres corps entrant dans la composition de celui-ci. Mais il fallait aussi que le milieu trouvât un substratum assez nutritif pour s'y développer normalement.

Un important travail de GALLIMARD (17), de Lyon, nous a fourni à ce sujet de très utiles renseignements ; l'auteur propose un certain nombre de milieux de culture, sur lesquels il a pu faire développer quelques microbes, parmi lesquels le Colibacille, et composés de sels minéraux, de glycérophosphates, de glycérine et d'acides aminés. Or, il était pour nous indispensable de ne pas introduire dès maintenant dans nos milieux des composés aminés ; ceux-ci étant considérés par GRIMBERT comme jouant un rôle important dans la dénitrification, nous auraient empêché de juger de l'influence de la glycérine. Quelques essais infructueux sur des

milieux formés exclusivement de sels minéraux et de glycérine eurent vite fait de nous montrer qu'il était indispensable de fournir à nos microbes une nourriture plus substantielle.

Nous avons alors additionné tous nos milieux de culture de 1 % de peptone; en effet les bacilles cultivent très bien sur l'eau peptonée, et la présence de celle-ci ne peut être une cause d'erreur puisque le *Bacterium coli* ne produit aucune destruction de nitrate en présence de peptone lorsque la teneur de celle-ci dans le milieu ne dépasse pas la proportion que nous venons d'indiquer. Ce fait a été démontré par GRIMBERT dans ses expériences sur la dénitrification. Toutefois, il ne faut pas dépasser cette quantité de 1 %, car GRIMBERT a signalé qu'une solution de peptone à 5 % donnait une faible destruction de nitrate, qu'il attribue non à la peptone même, mais à des impuretés qu'elle contiendrait en très petite quantité. Enfin, nous avons choisi la peptone COLLAS de préférence à toute autre, parce qu'elle ne renferme pas d'albumoses primaires; cependant, elle précipite en partie par le sulfate d'ammoniaque à saturation: elle contient donc des albumoses secondaires.

Nous nous sommes donc arrêté à la formule suivante :

Peptone COLLAS	1 gr
Glycérine	2 cc
Azotate de potasse	1 gr
Eau distillée	Q. S. pour 100 cc

Dès le deuxième jour nous avons obtenu un faible dégagement gazeux accompagné d'une mousse assez abondante. Le dégagement gazeux s'est poursuivi jusqu'au septième jour, puis a cessé. Nous avons alors, après nous être assuré qu'il ne se dégagait plus de bulles gazeuses, arrêté la culture et effectué les dosages suivants, en regard desquels nous plaçons les dosages correspondants effectués avant séjour à l'étuve :

Réaction (après culture)	faiblement acide.
Azotate avant	1gr02
— après	1gr01
— détruit	0gr01
Soit	1 %
Azotite restant	0gr074

La quantité d'azotate détruit est très faible puisqu'elle atteint à peine 1 %. D'autre part elle n'aurait certainement pas augmenté puisque le milieu avait cessé de cultiver.

Si nous comparons ce chiffre avec ceux qui sont obtenus dans les cas positifs, et qui lui sont toujours au moins huit à dix fois supérieurs, nous sommes amené à le considérer comme négligeable, ou tout au moins n'ayant aucune relation avec la présence de glycérine, puisque la peptone seule, lorsqu'elle est en quantité suffisante, produit une destruction de deux fois et demie à six fois supérieure à celle constatée ici.

C'est d'ailleurs pour cette raison que nous nous garderons de tirer aucune conclusion des quelques rares expériences qui nous ont donné une destruction de nitrate trop faible.

Un milieu identique au précédent, mais auquel avait été ajoutée une faible quantité de gélatine, n'a pas donné de résultats plus satisfaisants. Sa composition était :

Peptone COLLAS	1gr
Gélatine pure POULENC.	2gr
Glycérine	1gr50
Azotate de potasse	1gr
CO ³ KH.	Q. S. pour alcaliniser
Eau.	Q. S. pour 100c ³

Après vingt et un jours de culture pendant lesquels une fermentation abondante s'était manifestée, accompagnée d'un dégagement de gaz atteignant près de 25 cm³, les dosages effectués nous ont donné les résultats que voici :

Réaction (après culture).	alcaline.
Azotate avant	1gr17 pour 100c ³ de culture
— après	1gr15 — — —
— détruit	0gr02 — — —
Soit.	1,8 %
Azotite restant.	0gr298
Soit.	25,4 %

Afin de nous mettre à l'abri de toute objection tirée du fait que la glycérine étant un alcool trop peu complexe, dont la présence n'est d'ailleurs nullement démontrée dans le bouillon ou dans l'extract de viande, nous avons employé un autre composé ternaire dont la présence a été signalée dans les milieux que nous venons de citer : le glycogène. Nous verrons plus loin que ce composé, placé dans des conditions bien plus favorables à la dénitrification que ne l'avait été la glycérine, a produit une destruction de nitrate qui n'a pas dépassé 2,6 0/0¹. Encore faut-il

1. Voir page 73.

remarquer que ce n'est probablement pas le glycogène qui est intervenu dans la réaction, mais le glucose provenant de son dédoublement sous l'action bactérienne.

La présence d'un sel ammoniacal à acide minéral ne paraît pas modifier sensiblement l'action de la glycérine.

Dans le milieu :

Peptone COLLAS	1 ^{sr}
Phosphate d'ammoniaque.	0 ^{gr} 50
Glycérine	1 ^{cc} 50
AzO ³ K	1 ^{sr}
CO ³ KH.	Q. S. pour alcaliniser.
Eau	Q. S. pour 100 ^{cc}

la destruction du nitrate reste très faible et peut encore être attribuée à la peptone seule; les résultats du dosage sont assez intéressants :

Réaction (après culture).	alcaline.
Azotate avant.	1 ^{gr} 05
— après.	1 ^{gr}
— détruit	0 ^{gr} 05
Soit.	4,8 %
Azotite restant	0 ^{gr} 356
Soit.	33 %

Donc si, comme le prétend JENSEN, il y a une relation entre la quantité de nitrate détruit et la nature de l'aliment carboné, il est possible d'affirmer qu'il n'y a aucune relation de cause à effet entre la présence de cet aliment carboné et la destruction du nitrate.

D'autre part, contrairement à la théorie d'AMPOLA et ULPANI(2), les nitrites et l'ammoniaque ne suffisent nullement à produire un dégagement d'azote élémentaire, puisque dans un milieu contenant environ 0 gr. 10 de nitrite et 0 gr. 28 d'ammoniaque nous n'avons constaté qu'une destruction de 1 % de nitrate, quantité que nous avons reconnue négligeable.

2. — Matières sucrées.

Les matières sucrées étant des substances particulièrement riches en carbone, et très fermentescibles, par conséquent plus faciles à utiliser par les bactéries comme source de carbone, nous avons constitué un certain nombre de milieux contenant non seulement des sucres divers, mais des quantités différentes pour

chaque milieu, d'un même sucre, nous mettant ainsi à l'abri des objections qui pourraient être soulevées par la présence d'une trop grande ou d'une trop petite quantité d'aliment carboné.

Les premiers milieux établis étaient à base de glucose et contenaient respectivement :

Milieu 1.		Milieu 2.		Milieu 3.	
Peptone C . . .	1gr	Peptone C . . .	1gr	Peptone C . . .	1gr
AzO ³ K	1gr	AzO ³ K	1gr	AzO ³ K	1gr
Glucose	0gr10	Glucose	0gr50	Glucose	2gr
CO ³ KH, Q. S.		CO ³ KH, Q. S.		CO ³ KH, Q. S.	
pour alcaliniser.		pour alcaliniser.		pour alcaliniser.	
Eau, Q. S pour.	100cs	Eau, Q. S. pour.	100cs	Eau, Q. S. pour.	100cs

Après un séjour de trente jours à l'étuve, les dosages nous ont donné les résultats suivants :

	Milieu 1.	Milieu 2.	Milieu 3.
Réaction (après culture) . .	Tr. faibl. acide.	Alcaline.	Alcaline.
Azotate avant	1gr00	1gr00	1gr04
— après	0gr99	1gr00	1gr04
— détruit	0gr01	0	0
Soit	1 %	0	0
Nitrite restant	0gr045	0gr028	0
Glucose avant	0gr10	0gr52	2gr00
— après	0	0gr14	0gr28
Soit : glucose détruit . . .	100 %	72 %	15 %

D'après les dosages de glucose, il est facile de constater que ce dernier a, dans les trois cas, subi une fermentation assez active : la quantité détruite, sans être proportionnelle à la dose de matière sucrée introduite dans les milieux, est cependant d'autant plus grande que le microbe en avait peu à sa disposition. Là où il y en avait peu, la totalité a disparu ; là où il y en avait beaucoup, 1/6 seulement est détruit par fermentation. Quant au nitrate, on le trouve intégralement ou presque, malgré que la culture eût été très florissante pendant toute la durée du séjour à l'étuve.

Il n'y a aucune indication à tirer des dosages de nitrite et d'ammoniaque ; en particulier pour ce dernier corps dont nous n'avons retrouvé qu'une fois une dose absolument négligeable.

Les mêmes essais ont été renouvelés avec le sucre de lait qui est très fortement attaqué par le bacille d'ESCHERICH, puisque c'est sa destruction qui est utilisée comme moyen de différenciation d'avec le bacille d'EBERTH.

Comme pour le glucose, nous avons institué trois milieux contenant chacun des quantités croissantes de lactose.

Milieu 4.		Milieu 5.		Milieu 6.	
Peptone C . . .	1 ^{gr}	Peptone C . . .	1 ^{gr}	Peptone C . . .	1 ^{gr}
AzO ³ K	1 ^{gr}	AzO ³ K	1 ^{gr}	AzO ³ K	1 ^{gr}
Lactose	0 ^{gr} 10	Lactose	0 ^{gr} 50	Lactose	2 ^{gr}
CO ³ KH, Q. S.		CO ³ KH, Q. S.		CO ³ KH, Q. S.	
pour alcaliniser.		pour alcaliniser.		pour alcaliniser.	
Eau, Q. S. pour.	100 ^{cs}	Eau, Q. S. pour.	100 ^{cs}	Eau, Q. S. pour.	100 ^{cs}

Après trois semaines de séjour à l'étuve, ces trois milieux ont dégagé des volumes gazeux d'autant plus grands qu'ils renferment plus de lactose, sans toutefois qu'il paraisse y avoir proportionnalité entre les quantités de gaz dégagées et les poids de lactose introduits.

Les dosages effectués sur ces trois milieux nous ont donné :

	Milieu 4.	Milieu 5.	Milieu 6.
Réaction (après culture) . .	Lég. acide.	Lég. acide.	Acide.
Azotate avant	1 ^{gr} 03	1 ^{gr} 03	1 ^{gr} 03
— après	1 ^{gr} 03	1 ^{gr} 03	1 ^{gr} 03
— détruit	0	0	0
Soit	0	0	0
Nitrite restant	0 ^{gr} 05	0 ^{gr} 09	0 ^{gr} 05
Lactose avant	0 ^{gr} 06	0 ^{gr} 50	1 ^{gr} 83
— après	0	0 ^{gr} 02	1 ^{gr} 02
Soit : lactose détruit	100 %	60 %	55 %

Le lactose a été détruit dans de très fortes proportions, et le nitrate n'a pas été touché.

Il est intéressant de remarquer en passant que l'un des principaux produits de la fermentation du lactose, l'acide lactique, auquel d'ailleurs est due la réaction acide des milieux, est incapable, lui aussi, de provoquer par sa présence, en tant qu'aliment carboné, la dénitrification. Nous n'insistons pas ici sur ce fait, la question devant être étudiée plus longuement un peu plus tard.

Nous n'avons pas voulu clore la série de nos essais sur les matières sucrées avec des résultats obtenus uniquement avec ces deux corps, aussi avons-nous fait un dernier milieu avec un autre sucre, le saccharose.

Ici encore, après un séjour prolongé à l'étuve, pendant lequel les bacilles se sont développés normalement, il nous a été possible de constater que les phénomènes se déroulaient non plus

comme dans le cas des milieux lactosés ou glucosés, mais comme sur la peptone seule, c'est-à-dire qu'il ne s'est produit aucune mousse, ni aucun dégagement gazeux. Autrement dit, le saccharose s'est comporté comme un corps inerte, il n'a pas été attaqué. Le fait n'était pas nouveau, mais il était bon d'en constater une fois de plus l'exactitude. Le dosage par la liqueur de FEHLING après interversion, nous a en effet donné exactement les mêmes chiffres avant et après culture.

De même pour l'azotate qui n'avait pas été touché.

3. — Acides organiques divers.

Dans sa classification des combinaisons de carbone favorables à la dénitrification, JENSEN avait signalé certains acides organiques, en particulier les acides butyrique, lactique et citrique. Il rangeait ces derniers sous la désignation de composés directement assimilables, par opposition avec la glycérine, le glucose, l'amidon, etc., qu'il considérait comme composés difficilement utilisables, c'est-à-dire ne pouvant servir qu'après leur décomposition.

Il nous était dès lors permis de supposer que les résultats négatifs obtenus jusqu'à présent, devaient être attribués au choix mauvais de l'aliment. Ces composés avaient déjà été utilisés auparavant dans les milieux nutritifs, mais indirectement seulement, puisqu'ils sont pour la plupart le résultat de la fermentation des hydrates de carbone. L'effet de leur intervention pouvait donc être déjà entrevu, mais on ne pouvait songer à conclure à une influence nulle de leur part, car ils n'existaient dans ces milieux qu'à dose infime; enfin, certains d'entre eux, comme l'acide tartrique, n'avaient pas encore été employés.

En nous adressant à cette catégorie de composés, nous n'avons pas fait un choix fantaisiste, car il suffit de se reporter aux multiples analyses de bouillons et d'extraits de viande faites jusqu'à ce jour, pour constater que, dans presque toutes, leurs auteurs signalent la présence d'une assez forte proportion d'acide lactique. Ne serait-ce pas ce produit, ou un autre à fonctions chimiques semblables, qui serait la cause de la dénitrification?

Ne voulant pas admettre sans contrôle les résultats signalés, nous avons cherché à constater par nous-même la présence de

cet acide dans les bouillons peptonés et dans l'extrait de viande qui avaient servi à nos premières expériences.

Le bouillon de bœuf peptoné, dilué et décoloré par contact prolongé avec le noir animal, ajouté dans la proportion de cinq à six gouttes au réactif d'UEFFELMAN¹, fait passer celui-ci de la teinte bleu améthyste à la teinte jaune. La même réaction effectuée avec le réactif de BERG² donne au liquide primitivement incolore, la même coloration jaune qu'avec le réactif précédent. Il est bon de remarquer que ces réactions sont caractéristiques, non pas seulement de l'acide lactique, mais de tous les acides organiques présentant au moins une fonction alcool. L'extrait de viande de LIEBIG en solution concentrée au quart donne les mêmes résultats.

Restait à chercher la nature de l'acide qui donne cette réaction. Il est probable que ce n'est pas un acide, mais plusieurs acides qui la donnent; aussi, le champ des recherches étant extrêmement vaste, nous avons pensé qu'il convenait d'identifier l'acide qui existe le plus vraisemblablement dans ces milieux, l'acide sarcolactique, dont la présence a été signalée dans les muscles.

Le bouillon étant un milieu déjà fort dilué, et capable de nous donner de ce fait des résultats douteux, nous nous sommes adressé à l'extrait de viande dont nous avons fait une solution au quart. Cette solution a été agitée dans une boule à robinet avec un volume égal d'éther, laissée en repos, puis décantée : la liqueur éthérée laissait, après évaporation, un liquide sirupeux à réaction fortement acide au tournesol. Ce résidu, repris par l'eau, puis neutralisé à l'ébullition par du carbonate de zinc³, a donné par refroidissement des prismes de lactate de zinc; il faut remarquer que ces cristaux ont mis plusieurs jours à se former, et n'ont pu être obtenus qu'après addition au liquide d'une faible quantité d'alcool et d'éther.

1. Réactif d'UEFFELMAN :

Fe ² Cl ⁶	11 gouttes.
Eau phénolée à 5 %	100 ^{cs}

2. Réactif de BERG :

Fe ² Cl ⁶	11 gouttes.
HCl pur	11 gouttes.
Eau	Q. S. pour 100 ^{cs} .

3. Ce carbonate de zinc a été préparé extemporanément par double décomposition entre le sulfate de zinc et le carbonate de soude, et purifié par de nombreux lavages à l'eau distillée sur l'entonnoir de BÜCHNER jusqu'à ce que l'eau recueillie ne précipite plus par le chlorure de baryum.

Restait à connaître la quantité d'acide lactique contenue dans nos milieux. Les dosages ont été faits par différence, en faisant bouillir une quantité connue du liquide contenant l'acide lactique avec un excès de solution décimale de soude, de façon à détruire la lactide et peut-être les lactones pouvant exister dans le milieu, puis l'excès d'alcali a été dosé au moyen d'une solution décimale d'acide sulfurique.

Nous avons obtenu :

Avec l'extrait de viande de LIEBIG, 14 gr. 6 d'acide lactique pour 100 gr. d'extrait.

Avec le bouillon de viande de bœuf non peptoné, 3 gr. 60 à 4 gr. 50 d'acide lactique pour 100 gr. de bouillon.

En présence de résultats aussi précis, il nous était permis de nous demander si les acides alcools qui entraient dans une aussi forte proportion dans la composition des milieux où la dénitrification se faisait bien, n'étaient pas la cause déterminante de ce phénomène.

Deux milieux contenant de l'acide lactique ont été institués, dans lesquels l'acide était neutralisé, pour le premier avec de la soude, pour le second avec de l'ammoniaque. Ils présentaient la composition suivante :

Milieu 1.		Milieu 2.	
Peptone COLLAS	1 gr	Peptone COLLAS	1 gr
Acide lactique bouilli . . .	1 c ³	Acide lactique bouilli . . .	1 c ³ 50
Soude. Q. S. pour alcali-		Ammoniaque. Q. S. pour	
niser.		alcaliniser.	
AzO ³ K.	1 gr	AzO ³ K.	1 gr
Eau distillée. Q. S. p.		Eau distillée. Q. S. pour	
100 c ³ .		100 c ³ .	

Ces deux milieuxensemencés avec une culture jeune de Coli-bacille sur bouillon, nous ont donné après quinze jours d'étuve les résultats suivants :

	Milieu 1.	Milieu 2
Réaction (après culture)	Alcaline.	Faibl. acide.
Azotate avant	1 gr 02	1 gr 00
— après	1 gr 01	0 gr 98
— détruit	0 gr 01	0 gr 02
Soit	1 %	2 %
Azotite restant	0 gr 587	0 gr 056
Soit	57 %	5,6 %

Ici encore la quantité de nitrate détruit est si faible que nous

ne pouvons en tirer aucune conclusion, nous conformant en cela à la règle que nous avons adoptée.

Il est bon de noter en passant que ces deux milieux ne sont formés que d'eau peptonée nitratée renfermant en plus un lactate alcalin. Or, comme nous l'avons déjà vu, le *B. Coli* ne dégage aucun gaz en présence de peptone et d'azotate. Or, il s'était dégagé une certaine quantité de gaz; d'où ceux-ci peuvent-ils provenir *sinon* du lactate, seul corps susceptible de se décomposer dans ces conditions. Nous n'insistons pas sur ce fait, nous réservant de nous y arrêter plus longuement.

Avec d'autres acides organiques, les uns acides et alcools, les autres simplement acides, les résultats n'ont guère été plus satisfaisants.

Dans trois milieux présentant tous la composition fondamentale suivante :

Peptone COLLAS	1gr
AzO ³ K	1gr
Eau distillée.	Q. S. pour 100c ³ .

nous avons introduit :

Dans le premier, *1 gr. 50 d'acide tartrique*,

Dans le second, *1 gr. 50 d'acide citrique*,

Dans le troisième, *1 cm³ d'acide valérianique*.

Ces acides ont été neutralisés par une quantité suffisante de soude, stérilisés, puis ensemencés. Ils ont donné des cultures très florissantes au bout de quelques heures, mais n'ont pas dégagé la moindre bulle gazeuse. *A priori*, le nitrate n'avait donc pas été décomposé; c'est ce que le dosage nous a confirmé :

	Milieu 1.	Milieu 2.	Milieu 3.
	—	—	—
Réaction (après culture) . .	Alcaline.	Alcaline.	Alcaline.
Azotate avant	1gr06	1gr067	1gr06
— après	1gr06	1gr067	1gr06
— détruit.	0	0	0
Soit.	0	0	0
Azotite restant.	0gr172	0gr154	0gr257
Soit.	16,2 %	14,4 %	24 %

De tous les résultats obtenus avec les alcools, avec les sucres et avec les acides organiques, le chiffre d'azotate détruit est resté nul dans presque tous les cas et a atteint très rarement 1, et une seule fois 2 ‰. Encore, pour ceux-ci, avons-nous de la peine à croire que l'aliment carboné introduit ait joué quelque rôle dans

cette destruction, la peptone pouvant à elle seule donner aux bactéries les moyens de produire une faible dénitrification (GRIMBERT). Il est vrai que dans nos expériences, la quantité de peptone employée était trop faible pour produire par elle-même une destruction de nitrate; mais alors l'aliment carboné est peut-être intervenu indirectement pour provoquer cette destruction, réagissant soit par voie chimique, soit par voie biologique sur un corps contenu dans la peptone.

C'est un fait que nous ne pouvons expliquer maintenant, mais sur lequel la suite de ces expériences jettera quelque lumière.

Nous pouvons donc, dès à présent, affirmer que la présence d'un aliment carboné ternaire (alcool, sucre ou acide à fonctions multiples) est absolument incapable de provoquer par lui seul la destruction du salpêtre.

Nous n'avons nullement la prétention de dire que GAYON et DUPETIT, puis plus tard JENSEN, se sont trompés en attribuant au carbone organique un rôle prépondérant, mais nous pensons qu'ils auraient dû chercher à préciser ce rôle; ils ont effectué leurs expériences sur des milieux trop complexes et qui renfermaient certainement des substances qu'ils n'ont pas remarquées, mais qui déterminaient une dénitrification appréciable, à condition que le carbone organique soit en quantité suffisante. La preuve en est que nous-même, avec des milieux beaucoup plus simples, contenant tout juste, en outre du nitrate, une matière organique strictement nécessaire pour assurer la vie végétative du microbe, et un corps ternaire chimiquement déterminé, nous n'avons pu obtenir que des cultures pures du *B. Coli* (qui est nettement reconnu comme un bacille dénitrifiant) manifestent leur propriété dénitrifiante.

II. — AUTRES ALIMENTS CARBONÉS.

Nous n'avons pas voulu abandonner ce côté de la question avant d'essayer dans les mêmes conditions un aliment carboné plus complexe que ceux essayés jusqu'à présent. Là, le choix du produit à employer était encore plus difficile; quelle fonction fallait-il choisir de préférence?

La peptone devait tout d'abord être éliminée puisque nous savions déjà qu'elle donnait un résultat négatif. Il ne fallait pas songer aux albumines dont la composition est trop mal connue

pour que nous songions à tirer de leur emploi quelque enseignement. D'ailleurs, la peptone COLLAS, que nous avons employée dans tous nos milieux, renferme elle-même des albumoses dont la présence, nous l'avons déjà constaté, ne peut favoriser la dénitrification.

Aussi, devant la difficulté du choix, nous avons pensé qu'il serait plus aisé d'employer des milieux relativement complexes, mais dont les différents composants sont presque tous connus. De cette façon, au cas où nous obtiendrions un résultat favorable, notre tâche serait rendue plus facile car nous pourrions procéder par élimination.

La gélatine pure, puis l'urine humaine, à des degrés de concentration différents, ont paru répondre le mieux à cet ensemble de conditions. Ces milieux renfermant en eux-mêmes des matières suffisamment nutritives, nous avons cru pouvoir les employer sans addition de peptone.

Un premier milieu présentant la composition suivante :

Gélatine pure de POULENC.	2 ^{sr}
AzO ³ K	1 ^{sr}
CO ³ KH	Q. S. pour alcaliniser.
Eau distillée	Q. S. pour 100 ^{cs} .

a pu fournir un substratum suffisant pour permettre le développement du B. Coli, puisque un mois après avoir été placé à l'éluve il était encore trouble. Par conséquent, le bacille cultivait encore abondamment. Néanmoins, pendant ce temps, il ne s'était produit aucun dégagement gazeux et le nitrate n'avait pas été touché, comme en témoignent les dosages suivants :

Réaction (après culture)	Alcaline.
Azotate avant	1 ^{sr} 21
— après.	1 ^{sr} 21
— détruit.	0
Soit.	0
Azotite restant.	0 ^{sr} 121

Avec le même milieu glycérimé dans la proportion de 1 gr. 50 %, nous avons obtenu un résultat presque identique :

Réaction (après culture)	Alcaline.
Gaz total.	25 ^{cs}
Azotate avant	1 ^{sr} 17
— après.	1 ^{sr} 15
— détruit.	0 ^{sr} 02
Soit.	1,8 %
Azotite restant.	0 ^{sr} 298
Soit.	25,4 %

L'urine normale, préalablement neutralisée, et portée à l'ébullition pour la débarrasser des phosphates rendus insolubles, s'est montrée moins favorable au développement des bactéries. Le liquide s'est d'abord troublé assez rapidement, puis, après quatre ou cinq jours, il a repris sa limpidité première et un dépôt assez abondant de bacilles s'est formé au fond du ballon.

Le milieu était ainsi constitué :

Urine fraîche.	100 ^{cc}
AzO ³ K	1 ^{gr}
CO ³ KH	Q. S. pour alcaliniser.

Il ne s'est dégagé aucun gaz et le nitrate n'a pas été touché.

Réaction (après culture)	Alcaline.
Azotate avant	1 ^{sr} 21
— après.	1 ^{sr} 21
— détruit	0
Soit.	0
Azotite restant	0 ^{sr} 148

Afin d'écartier toute objection tendant à attribuer le résultat obtenu à la faible teneur du milieu en éléments nutritifs, nous avons concentré au bain-marie une autre portion de la même urine, de 1.000 cm³ à 250 cm³, soit au quart. Celle-ci, après filtration suivie de neutralisation et de précipitation des phosphates, a étéensemencée dans les mêmes conditions que la précédente :

Urine concentrée au 1/4	100 ^{cc}
AzO ³ K	1 ^{gr}
CO ³ KH	Q. S. pour alcaliniser.

Ce milieu ne s'est pas montré plus nutritif que le précédent, car, après la première semaine, le même dépôt de bactéries se produisait, accompagné de limpidité de la liqueur. Le temps pendant lequel la culture avait vécu d'une vie active s'était assez prolongé pour nous permettre de considérer la tentative comme suffisante : il ne s'était alors dégagé aucun gaz. Nous avons attendu néanmoins que cinq semaines se soient écoulées, pour faire les dosages dont voici les résultats :

Azotate avant.	1 ^{sr} 43
— après.	1 ^{sr} 43
— détruit	0
Soit	0
Azotite restant	0 ^{sr} 267

Ces trois expériences nous permettent d'éliminer toute une série de composés, d'une part les albuminoïdes, en l'espèce la gélatine, d'autre part les multiples composés de l'urine, acide urique, urée, créatine, créatinine, sels minéraux et organiques.

VI

INFLUENCE DES SELS MINÉRAUX

Il n'était pas possible de penser que les sels minéraux jouent un rôle chimique quelconque dans la destruction des nitrates, mais nous nous sommes demandé si ceux-ci, par leur présence, n'étaient pas de nature à communiquer aux bactéries, en les mettant dans des conditions d'existence plus favorables, un pouvoir que la peptone seule était incapable de leur donner. D'ailleurs le bouillon et l'extrait de viande ne contiennent-ils pas la plus grande partie des sels solubles qui existent dans les tissus vivants?

Bien qu'une telle hypothèse nous paraisse assez risquée, il nous a paru bon de chercher à en connaître la valeur.

Nous savons déjà, par nos essais sur l'urine, que, en l'absence des matières albuminoïdes, il ne faut rien attendre de ces substances, aussi nos essais ont-ils tous porté sur des solutions préalablement peptonées à 1 %, glycinées ou non glycinées.

Nous avons préparé quatre milieux composés de :

Peptone COLLAS	1 ^{gr}
Azotate de K.	1 ^{gr}
CO ³ KH.	Q. S. pour alcaliniser.
Eau distillée.	Q. S. pour 100 ^{cc} .

dans chacun desquels nous avons ajouté successivement :

1 ^o	Chlorure de sodium.	0 ^{gr} 50
2 ^o	Phosphate disodique	0 ^{gr} 50
3 ^o	{ Phosphate disodique	0 ^{gr} 50
	{ Chlorure de sodium.	0 ^{gr} 50
	{ Phosphate disodique	0 ^{gr} 50
4 ^o	{ Chlorure de sodium.	0 ^{gr} 50
	{ Glycérine.	1 ^{gr} 50

Ces milieux se sont comportés en tout et pour tout comme s'ils ne contenaient que de la peptone; ils ont parfaitement cultivé,

mais n'ont donné aucun dégagement gazeux appréciable, sauf celui renfermant de la glycérine. Encore le gaz recueilli dans ce dernier cas était-il absolument exempt d'azote, et ne renfermait-il que les gaz fournis par la fermentation de la glycérine.

L'examen des résultats obtenus en dira d'ailleurs plus long que tout commentaire :

	1 ^{er} milieu.	2 ^e milieu.	3 ^e milieu.	4 ^e milieu.
	—	—	—	—
Réaction (après culture) . .	Alcaline.	Alcaline.	Alcaline.	Alcaline.
Azotate avant.	1 ^{sr} 06	1 ^{sr} 07	1 ^{sr} 11	1 ^{sr} 03
— après.	1 ^{sr} 06	1 ^{sr} 07	1 ^{sr} 11	1 ^{sr} 03
— détruit	0	0	0	0
Soit.	0	0	0	0

La quantité d'azotate détruit dans ces quatre milieux est donc nulle. Bien que le résultat fût à prévoir, nous tenions à signaler ces expériences, faites d'ailleurs dans la période de début de ce travail, pour montrer que nous n'avons pas fait nos recherches sur des milieux de composition quelconque, établis à tout hasard, mais qu'au contraire nous avons essayé systématiquement tous les produits qui avaient été précédemment signalés par divers auteurs comme favorisant la destruction des nitrates, ou que nous avons considérés nous-même comme susceptibles de développer cette propriété chez les bactéries à la disposition desquelles ils étaient placés.

VII

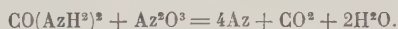
RÔLE DES ACIDES AMIDÉS SEULS

A la suite de ses expériences très précises sur le bouillon peptoné nitraté et sur les solutions d'extrait de viande, GRIMBERT, après avoir établi une ligne de démarcation très nette entre les microbes dénitrifiants vrais et les microbes dénitrifiants indirects, avait jeté un jour tout à fait nouveau sur la marche de la dénitrification dans ce dernier cas.

Pour lui, la première étape de la destruction du nitrate, jusqu'à la phase nitrite, reste toujours une œuvre exclusivement bactérienne, tandis que la seconde, depuis la phase nitrite jusqu'au terme azote libre est due à une action chimique qui est peut-être intimement liée à la présence du bacille, qui a opéré la première phase de la dénitrification.

La preuve évidente que la dénitrification complète n'est pas une propriété intrinsèque du bacille, est que ce dernier, suivant le milieu sur lequel on le cultive, peut décomposer jusqu'à 20 % de nitrate; ou n'en pas détruire du tout, bien que son développement soit dans les deux cas aussi complet.

La dénitrification ne se produisant qu'en présence du bouillon lui-même ou en présence de son extrait, GRIMBERT pensa que les corps aminés ou amidés qui existent toujours dans le bouillon, intervenaient dans la dénitrification, par leur réaction sur l'acide nitreux provenant de la décomposition des nitrites sous l'action d'un acide. La réaction pouvant se représenter par l'équation suivante :



Cette théorie avait le grand avantage d'expliquer à la fois la présence de l'azote et de l'acide carbonique dans les produits de la réaction, lesquels se présentent d'une façon constante dans toute dénitrification indirecte; alors que toutes les hypothèses

fournies jusqu'alors étaient incapables d'expliquer la présence de l'acide carbonique. Telle la théorie de MARPMANN sur le rôle réducteur de l'hydrogène, celle de WOLF sur l'action de l'acide carbonique sur les nitrites et enfin celle assez invraisemblable de STOKLASA sur le rôle de la fermentation alcoolique. Ce dernier auteur, attribuant ainsi à l'alcool un rôle prépondérant dans la dénitrification, alors que la présence de ce corps n'a jamais été constatée dans aucune expérience de ce genre.

Quatre ans après GRIMBERT, HUGO WEISSEMBERG avait émis la même hypothèse que lui, sur le rôle des substances aminées, mais avec cette restriction que la réaction ne pouvait se produire qu'en milieu acide. Or, chacun sait que les bactéries ne peuvent se développer qu'en milieu neutre ou légèrement alcalin. Comment WEISSEMBERG ne fût-il pas arrêté par cette considération? Nous l'ignorons, mais il n'en est pas moins certain qu'il considéra sa théorie comme fondée puisqu'il la publia.

Nous avons vu plus haut comment GRIMBERT démontra que le mélange d'un nitrate et d'un corps amidé pouvait donner naissance à de l'azote et à de l'acide carbonique libres sous l'action d'un acide, même en milieu très fortement alcalin¹. Nous ne reviendrons donc pas sur cette question.

La théorie de GRIMBERT, quoique fort bien assise déjà par ses expériences sur bouillon, devait être complétée par d'autres expériences sur des milieux moins complexes que ces derniers. Si les acides aminés sont seuls nécessaires à la destruction des nitrites, il suffira d'ajouter l'un de ces corps, en quantité au moins égale à celle qui existe dans le bouillon, pour obtenir une dénitrification identique.

C'est dans le but d'étudier ce rôle des acides aminés que nous avons préparé les milieux² suivants renfermant les quantités de peptone et d' AzO^3K déjà indiquées pour nos précédents milieux et renfermant en outre :

Le premier milieu glyocolle .	$0\text{gr}15 + \text{NaCl}$	$0\text{gr}50$
Le second milieu glyocolle .	$0\text{gr}25 + \text{NaCl}$	$0\text{gr}50$
Le troisième milieu glyocolle.	Traces.	

Après vingt-quatre jours de séjour à l'étuve, il ne s'était

1. Voir page 29.

2. Au moment où nous avons fait cette expérience, nous croyions que la présence d'un peu de NaCl était nécessaire à la vie du microbe et par suite à la bonne marche de la réaction.

dégagé aucun gaz, et le dosage du nitrate nous a donné les résultats suivants :

	1 ^{er} milieu.	2 ^e milieu.	3 ^e milieu.
Réaction (après culture) . . .	Alca'ine.	Alcaline.	Alcaline.
Azotate avant	1gr06	1gr11	1gr02
— après	1gr06	1gr11	1gr02
— détruit	0	0	0
Azotite restant	»	»	0gr062
Soit	»	»	»

Deux autres milieux renfermant :

Le premier.	{	Phosphate disodique	0gr50
		Glycocolle	0gr15
Le deuxième.	{	Phosphate disodique	0gr50
		Chlorure de sodium	0gr50
		Glycocolle	0gr25

nous ont donné des résultats également négatifs.

Après vingt-quatre jours de culture pour le premier et trente-deux jours pour le second, il ne s'était pas dégagé de gaz et les dosages nous fournissaient les chiffres suivants :

	1 ^{er} milieu.	2 ^e milieu.
Réaction (après culture)	Alcaline.	Alcaline.
Azotate avant	1gr07	1gr11
— après	1gr07	1gr11
— détruit	0	0
Soit	0	0
Azotite restant	»	0gr267
Soit	»	24 %

Devant une telle série d'expériences négatives faites sur des milieux variés, avec un même acide amidé, nous avons pensé qu'il serait prudent, avant d'abandonner cette voie, de renouveler les mêmes expériences avec d'autres acides amidés de complexités diverses.

Mais chacune de ces expériences demandant un temps très long, nous avons fait une série d'essais qualitatifs, nous réservant de renouveler, avec dosages à l'appui, ceux-là seulement pour lesquels un dégagement gazeux se serait manifesté.

Les appareils employés pour cela étaient fort simples : c'étaient des tubes à essais fermés par un bon bouchon paraffiné traversé par un tube étroit allant d'une part jusqu'au fond du tube, se recourbant en V à sa sortie du bouchon, de telle façon que la partie ouverte, très finement effilée et tournée de haut en bas, ne puisse

être une entrée pour les bactéries de l'atmosphère, susceptibles de contaminer le milieu.



De cette façon, le tube se trouvant complètement rempli après ensemencement, si un dégagement gazeux venait à se produire, les gaz se réuniraient dans l'espace annulaire, provoquant ainsi la sortie par le tube central d'un volume de liquide égal à leur propre volume.

Ainsi, la plus petite quantité de gaz dégagé devenait perceptible, et il nous était alors facile de renouveler les milieux qui nous auraient donné un résultat positif, en y effectuant tous les dosages nécessaires.

Dans une série de ces appareils, nous avons introduit de l'eau peptonée additionnée de petites quantités de chacun des corps suivants :

1° Asparagine ; 2° alanine ; 3° acide aspartique-i ; 4° carnine ; 5° créatine ; 6° créatinine ; 7° acide glutamique ; 8° glycocolle ; 9° leucine (insoluble dans les conditions de l'expérience) ; 10° urée ; 11° acide urique ; 12° Liebig ; 13° peptone seule ; 14° bouillon peptoné.

Après quinze jours, tous les milieux s'étaient troublés, donc ils avaient cultivé, mais seuls avaient dégagé des gaz les milieux 12 et 14, qui nous servaient de témoins.

Le *Bacterium coli* ne peut donc pas décomposer les nitrates dans un milieu renfermant seulement de la peptone et un acide amidé.

Or, GRIMBERT avait dit en 1898 que « l'action dénitrifiante de ces bacilles (*Coli* et *EBERTH*) est corrélatrice de la présence de matériaux amidés dans la culture ». Si l'on prend à la lettre cette affirmation, c'est-à-dire si nous voulons comprendre qu'il entend parler des acides amidés seuls, nous pouvons répondre dès maintenant par la négative.

Mais ce n'est pas ce que GRIMBERT a voulu dire ; s'il prétend que le rôle prépondérant est joué par les acides amidés, il ne veut pas dire que ceux-ci seuls sont nécessaires. Il émettait à cette époque une simple hypothèse n'ayant fait encore aucune expérience pour la contrôler ; il indiquait la voie à suivre sans pouvoir encore préciser les conditions nécessaires à la bonne conduite de l'expérience.

Ce sont ces conditions que nous avons étudiées. Dans les chapitres qui suivent, nous énumérons la série de nos essais.

VIII

INFLUENCE COMBINÉE DES ACIDES AMIDÉS ET DES SUBSTANCES SALINES

Nous rappellerons seulement pour mémoire les quelques expériences qui ont été faites en présence d'un acide amidé et de substances salines, le chlorure de sodium et le phosphate disodique.

Les milieux renfermaient, en outre de la peptone et de l'azotate de potassium :

Le 1^{er} : glyocolle. 0^{gr}25 + NaCl. 0^{gr}50

Le 2^e : glyocolle. 0^{gr}15 + NaCl. 0^{gr}50

Le 3^e : glyocolle. 0^{gr}25 + NaCl. 0^{gr}50

Le 4^e : glyocolle. 0^{gr}15 + Phosphate disodique. 0^{gr}50

Le 5^e : glyocolle. 0^{gr}25 + Phosphate disodique. 0^{gr}50 + NaCl. 0^{gr}50

Après un séjour à l'étuve de trente jours, aucun de ces milieux n'avait dégagé de gaz et le nitrate était partout resté inattaqué. Enfin, la réaction n'avait subi aucun changement.

L'association des sels minéraux aux acides amidés est donc absolument inutile à la dénitrification.

IX

INFLUENCE DES ACIDES AMIDÉS EN PRÉSENCE D'UN ALIMENT CARBONÉ

A. *Glycérine*. — Nos premiers essais ont été faits sur un milieu comportant à la fois du glyocolle et de la glycérine, plus, bien entendu, de la peptone, absolument indispensable à la vie végétative du microbe.

Peptone COLLAS.	1gr
Glyocolle	Traces
Glycérine.	1c ^s
Azotate de K.	1gr
CO ³ KH	Q. S. pour alcaliniser.
Eau distillée	Q. S. pour 100c ^s

Ce milieu est resté pendant dix-sept jours à l'étuve ; un assez abondant dégagement gazeux s'étant produit, nous avons procédé aux dosages :

Azotate avant.	1gr02
— après.	0gr93
— détruit	0gr09
Soit.	8 %
Azotite restant	0gr067
Réaction (après culture).	faiblement alcaline.

Voici donc le premier résultat positif obtenu. Dans un milieu de composition aussi simple que possible, il a suffi de quinze jours pour obtenir une destruction de 8 % du nitrate. A titre de contrôle, nous avons fait une série de milieux de composition identique et nous avons fait les mêmes dosages. Ces expériences ont été réparties sur l'ensemble des années pendant lesquelles ce travail nous a appelé au laboratoire, nous les avons renouvelées dans l'unique but de contrôler que notre microbe jouissait tou-

jours du même pouvoir dénitrifiant. Nous les réunissons toutes ici :

Glycocolle	0gr25
NaCl	0gr50
SO ⁴ Mg	0gr05
Glycérine.	1c ³ 50
Peptone COLLAS.	1gr
CO ³ KH	Q. S. pour alcaliniser.
AzO ³ K	1gr
Eau	Q. S. pour 100c ³

Ce milieu, après ensemencement, est resté à l'étuve depuis le 7 janvier 1908 jusqu'au 4 novembre de la même année. Il nous a donné les résultats que voici :

Azotate avant	1gr03
— après	0gr877
— détruit	0gr153
Soit.	14,9 %

D'autres milieux identiques nous ont donné des chiffres aussi satisfaisants :

Ces milieux, également à base de glycocolle, de peptone et de glycérine, ainsi que de nitrate de potasse, renfermaient en outre :

Le premier.	{ NaCl	0gr50
	{ SO ⁴ Mg	0gr05
Le deuxième.	Phosphate disodique	0gr50
	{ Phosphate disodique	0gr50
Le troisième.	{ NaCl	0gr50

Résultats des dosages :

	Milieu 1.	Milieu 2.	Milieu 3.
Azotate avant	1gr13	1gr09	1gr03
— après.	0gr922	0gr922	0gr85
— détruit	0gr208	0gr168	0gr18
Soit.	19,0 %	16,8 %	17,5 %
Azotite restant.	0gr202	0gr395	0gr096
Soit.	18,7 %	36,2 %	9,2 %
Réaction (après culture) . .	Neutre.	Faibl. alcal.	Faibl. alcal.

Lorsque le séjour à l'étuve a duré au moins un mois, la quantité de nitrate détruit varie donc entre 15 et 20.°/.

Ces résultats sont très supérieurs à ceux que nous attendions puisque nous avons obtenu avec la glycérine comme aliment carboné, une destruction de 14,9 % à 19 %, alors que GRIMBERT, dans ses expériences sur le bouillon de viande peptoné, et sur les

solutions peptonées d'extrait de viande, avait obtenu des chiffres notablement inférieurs aux nôtres : 8,90 % — 9,40 % — 4,40 % — 11,20 % — 4,72 % — 9,44 %.

Mais la présence de glycérine n'a été signalée ni dans le bouillon, ni dans l'extrait de viande ; il se peut qu'il en existe là de très faibles quantités, suffisantes néanmoins pour permettre la destruction du nitrate, mais ces quantités doivent être extrêmement faibles.

C'est pourquoi nous avons songé à substituer à la glycérine d'autres corps présentant au moins une fonction alcool et dont la présence ait été constatée dans les préparations à base de viande. De nombreuses analyses signalent la présence de glucose, nous-même avons recherché cet élément dans le bouillon par la méthode des osazones et nous en avons trouvé de faibles quantités ; nous en avons également trouvé dans quelques autres marques d'extraits, mais nous devons remarquer que l'extrait de Liebig qui a toujours servi à nos expériences, ne nous a jamais donné de résultat positif.

B) *Glucose*. — Nous avons néanmoins introduit 1 % de glucose dans certains milieux, en place de glycérine, et nous avons obtenu les mêmes résultats qu'avec celle-ci :

Azotate avant.	1gr08	1gr21
— après.	1gr03	1gr03
— détruit.	0gr05	0gr18
Soit.	14,7 %	14,8 %
Azotite restant.	0gr114	0gr129
Soit.	10,5 %	10,6 %
Réaction (après culture).	Alcal.	Alcal.

C) *Lactose*. — Dès maintenant nous avons pensé que la destruction du nitrate pouvait être obtenue non pas seulement avec la glycérine ou le glucose, mais avec tout corps présentant comme eux au moins une fonction alcool, et nous avons essayé un autre sucre, le lactose, également dans la proportion de 1 %.

Les chiffres obtenus se passent de commentaires :

Azotate avant.	1gr18	1gr17
— après.	1gr04	0gr99
— détruit.	0gr14	0gr18
Soit.	12 %	16,3 %
Azotite restant.	0gr175	0gr113
Soit.	14,7 %	9,6 %
Réaction (après culture).	Alcal.	Alcal.

D) *Saccharose*. — Avec le saccharose, les résultats ne sont plus les mêmes. En effet, si nous remplaçons le glucose ou le lactose par du saccharose, notre microbe cultive encore, mais il ne se produit aucune destruction de nitrate :

Azotate avant.	1gr16
— après.	1gr16
— détruit.	0
Azotite restant.	0gr343
Réaction (après culture).	Alcal.

E) *Glycogène*. — D'autres composés plus complexes, comme le glycogène, ne provoquent, eux non plus, aucun dégagement gazeux ni aucune destruction du nitrate. Nous verrons plus loin pourquoi.

Azotate avant.	1gr16
— après.	1gr13
— détruit.	0gr03
Soit.	2,6 %
Azotite restant.	0gr283
Soit.	24,3 %
Réaction (après culture).	Alcal.

F) *Acides alcools*. — Poursuivant nos recherches dans le même sens, nous avons songé aux acides alcools; ceux-ci, préalablement neutralisés de façon à rendre le milieu propre au développement des bactéries, ont été employés méthodiquement.

La glycérine a été successivement remplacée par l'acide lactique, l'acide tartrique et l'acide citrique.

Il est bon de rappeler, avant d'entrer dans le détail des expériences, que certains acides alcools donnent des éthers internes ou lactones, et que ces combinaisons sont détruites à haute température; il est donc indispensable de porter le milieu à l'ébullition avant toute neutralisation, sans quoi la réaction acide reparaîtrait après stérilisation du milieu, empêchant ainsi toute culture. Les lactones ne peuvent exister que pour les acides dans lesquels la fonction alcool qui éthérifie une fonction acide, est séparée de celle-ci au moins par un atome de carbone intermédiaire; l'acide lactique ne donne pas de lactone. Néanmoins, il donne lui aussi un éther, la dilactide, par éthérification de deux molécules d'acide lactique. Cette combinaison est détruite, elle aussi, par l'ébullition prolongée, comme les précédentes.

Si donc nous substituons aux composés carbonés employés jusqu'à présent, l'acide lactique neutralisé, nous obtenons un milieu présentant la composition suivante :

α. Acide lactique :

Peptone COLLAS.	1gr
Glycocolle	0gr25
Acide lactique bouilli.	1 ³
NaOH.	Q. S. pour alcaliniser.
AzO ³ K	1gr
Eau	Q. S. pour. 100c ³

Après trente et un jours de séjour à l'étuve, les dosages nous donnent les résultats suivants :

Azotate avant	1gr27
— après	0gr97
— détruit	0gr30
Soit.	24 %
Azotite restant	0gr039
Soit.	3,07 %
Réaction (après culture).	très faiblement alcaline.

Dans un autre milieu, de composition semblable, nous avons constaté qu'après cent sept jours à l'étuve, la quantité de nitrate détruit était identique, à peu de chose près, à celle de l'expérience précédente. Nous avons en effet :

Azotate avant.	1gr89
— après	1gr49
— détruit	0gr40
Soit	21,1 %
Azotite restant	0gr129
Soit	6,7 %
Réaction (après culture).	nettement alcaline.

Si l'on vient à neutraliser l'acide par une autre base que la soude, la chaux par exemple, la destruction du nitrate se produit encore, mais en beaucoup plus faible proportion :

Peptone COLLAS.	1gr
Glycocolle	0gr25
Acide lactique bouilli.	1c ³
Craie en excès	Q. S.
AzO ³ K	1gr
Eau distillée.	Q. S. pour 100c ³

Après douze jours de culture, les dosages ont donné :

Azotate avant	1gr04
— après	0gr95
— détruit	0gr09
Soit	9 %
Azotite restant	0gr458
Soit	44 %
Réaction (après culture)	Alcal.

Ces expériences viennent très nettement à l'appui de notre hypothèse sur la nécessité de la présence d'un corps à fonction alcoolique pour que le *B. Coli* puisse détruire les nitrates.

β. *Acides tartrique et citrique*. — Nous avons dès lors poursuivi nos essais dans ce sens en remplaçant l'acide lactique par d'autres acides à même fonction, l'acide tartrique et l'acide citrique.

Nous avons établi des milieux semblables au précédent, en substituant l'un de ces acides à l'acide lactique.

Après trente-six jours d'étuve, ces milieux n'avaient presque pas dégagé de gaz, et il n'y avait pas eu de nitrate détruit. Voici d'ailleurs les résultats des dosages :

	Acide tartrique.	Acide citrique.
Azotate avant	1gr048	1gr085
— après	1gr048	1gr085
— détruit	0	0
Soit	0	0
Azotite restant	0gr163	0gr265
Soit	15,5 %	24,4 %
Réaction (après culture)	Alcaline.	Alcaline.

G) *Acide valériannique*. — A titre de contrôle, nous avons institué un milieu à base d'acide organique à fonction simple ; pour cet essai nous avons choisi l'*acide valériannique* comme présentant une teneur en carbone suffisante, les acides les plus simples de la série pouvant ne pas fournir un élément nutritif aussi favorable à nos microbes.

Soumis à la température de $+ 37^{\circ}$ pendant douze jours, ce milieu s'est troublé, mais n'a dégagé aucun gaz ; de plus, il n'y a pas eu la moindre trace de nitrate détruit.

Les chiffres fournis par les dosages ont été :

Azotate avant	1gr06
— après	1gr06
— détruit	0
Azotite restant	0gr257
Soit	24 %
Réaction (après culture)	Alcal.

*
*
*

Un corps à fonction alcool est donc nécessaire, mais cette condition n'est pas suffisante ; *il faut, de plus, que ce corps soit susceptible de fermenter sous l'action du microbe mis en culture.*

Si nous jetons un coup d'œil en arrière sur les expériences faites, nous voyons que seuls, la glycérine, le glucose, le lactose et l'acide lactique ont permis au *B. Coli* de détruire jusqu'à 20 % du nitrate mis à sa disposition.

Au contraire, le saccharose, l'acide tartrique et l'acide citrique n'ont donné lieu à aucune destruction.

Cette différence d'activité entre des substances à fonctions semblables *a priori*, nous en trouvons l'explication très simple dans ce fait que, pour qu'il y ait destruction de nitrate par les bactéries dénitrifiantes indirectes, il faut (22) :

1° Qu'il y ait d'abord réduction du nitrate en nitrite ;

2° Que le milieu contienne à la fois des substances amidées ou aminées et des aliments carbonés capables d'être attaqués par le microbe en donnant des acides.

Ces faits ont été nettement établis par l'expérience cruciale suivante : partant de la propriété bien connue qu'a le bacille d'ESCHERICH de détruire le lactose en donnant de l'acide lactique, tandis que le bacille d'EBERTH est incapable de décomposer ce sucre dans les mêmes conditions, nous avons institué une série de trois milieux identiques en tous points, sauf en ce qui concerne l'aliment carboné.

Deux milieux renfermant du lactose ont été ensemencés, l'un avec le *B. Coli*, l'autre avec le Bacille d'EBERTH, et un troisième milieu servant de témoin renfermant du glucose au lieu de lactose, a été ensemencé avec de l'EBERTH. Ces milieux, après séjour d'un mois à l'étuve, nous ont donné les résultats typiques que nous exposons dans le tableau suivant. Pour que ces expériences soient plus probantes, nous les avons effectuées en double.

Les milieux présentaient la composition suivante :

Glycocolle	0gr25
Hydrate de carbone	1gr
Peptone COLLAS	1gr
CO ³ KH	Q. S. pour alcaliniser.
AzO ³ K	1gr
Eau distillée	Q. S. pour 100cc ³

Le premier contenant du *lactose* a étéensemencé avec du *B. Coli*.

Le deuxième, également avec du *lactose*, a étéensemencé avec de l'EBERTH.

Enfin dans le troisième, l'hydrate de carbone était représenté par du *glucose*, et le milieu a étéensemencé avec de l'EBERTH.

Tous ces milieux ont cultivé abondamment pendant trente jours à l'étuve, mais seuls les milieux où l'EBERTH était en présence du lactose n'ont pas dégagé de bulles gazeuses. Jusqu'ici rien de surprenant, mais là où le fait devient plus intéressant, c'est lorsque l'on constate que dans ces deux milieux et dans ceux-là seulement, il n'y a eu absolument aucune destruction de *nitrate*.

Voici d'ailleurs les chiffres que nous ont donnés les dosages :

	COLI SUR LACTOSE		EBERTH SUR LACTOSE		EBERTH SUR GLUCOSE	
Azotate avant. . . .	4gr18	4gr17	4gr19	4gr37	4gr41	4gr38
— après. . . .	4gr04	0gr99	4gr19	4gr37	4gr11	4gr06
— détruit	0gr14	0gr18	0	0	0gr30	0gr32
Soit.	12 %	16,3 %	0	0	21,4 %	23,2 %
Azotite restant . . .	0gr175	0gr113	0gr096	0gr378	0gr050	0gr045
Soit.	14,7 %	9,6 %	8 %	27,5 %	3,5 %	3,2 %
Réaction après culture	Alcal.	Alcal.	Alcal.	Alcal.	Alcal.	Alcal.

Le mécanisme de la dénitrification apparaît donc des plus simples : la bactérie attaquant l'aliment carboné, donne naissance à un acide qui agit sur le nitrite et provoque la réaction immédiate de l'acide nitreux sur le corps aminé; d'où mise en liberté d'azote et d'acide carbonique, pendant que l'acide se combine à l'alcali du nitrate, d'où neutralité de la solution.

Dans nos expériences, le saccharose et le valérienate de soude n'avaient donné lieu à aucune destruction de nitrate en présence de glyocolle, parce que ces deux substances n'étaient pas attaquées par le Colibacille.

Il faut donc, pour qu'il y ait destruction du nitrate par le bacille, que celui-ci ait à sa disposition un aliment carboné susceptible de subir directement la fermentation sous l'action du bacille.

Cette théorie est très suffisamment établie par les dernières expériences rapportées, et elle est encore affirmée par les essais faits avec les acides tartrique, citrique et lactique.

En effet, ceux-ci sont loin de se comporter de la même façon lorsqu'ils sont introduits dans des milieux très simples ne comportant que de la peptone; les uns ne donnent aucun dégagement gazeux malgré que la culture soit très vivante, tandis que l'autre met en liberté une forte quantité de gaz.

Deux milieux, exempts de nitrate et de corps amidé ou aminé, mais renfermant l'un de l'*acide tartrique*, l'autre de l'*acide citrique*, n'ont pas donné la moindre bulle gazeuse.

Il n'en a pas été de même des milieux à base d'acide lactique; ceux-ci nous ont toujours donné au bout d'un temps relativement court, un dégagement gazeux appréciable. Nous avons même songé à doser l'acide lactique avant culture et après culture; ces dosages nous ont déjà donné d'intéressants résultats, mais nous nous contenterons pour l'instant de signaler le fait, nous réservant de continuer prochainement cette étude.

De ces expériences nous pouvons conclure que si on ajoute à la fois à la solution de peptone nitratée un hydrate de carbone ou un acide organique et une substance amidée ou aminée, on obtient immédiatement une dénitrification active, à la condition que l'aliment carboné soit attaqué par le Colibacille.

X

REMPLACEMENT DU GLYCOCOLLE PAR D'AUTRES CORPS AMINÉS ET AMIDÉS

Le glycocolle en présence d'un aliment carboné directement fermentescible permet au *B. Coli* de décomposer le nitrate : telle est la conclusion que l'on peut tirer de nos expériences; reste à établir si d'autres substances à fonction identique ou même voisine peuvent donner les mêmes résultats.

Nous nous sommes demandé tout d'abord si l'ammoniaque en combinaison saline remplissait les conditions voulues. Nous avons établi un milieu renfermant en place de glycocolle du phosphate d'ammoniaque et qui présentait la composition que voici :

Peptone COLLAS.	1gr
Phosphate d'ammoniaque.	0gr50
Glycerine	1c350
CO ³ KH.	Q. S. pour alcaliniser.
AzO ³ K.	1gr
Eau distillée.	Q. S. pour 100c ³

Ce milieu, ensemencé avec le *B. Coli*, est resté pendant quinze jours à l'étuve; pendant cette période, il s'est dégagé une petite quantité de gaz provenant de la fermentation de la glycérine, et une très faible quantité de nitrate a été détruite. Voici les résultats qui nous ont été donnés par les dosages :

Azotate avant	1gr05
— après.	1gr00
— détruit.	0gr05
Soit.	4,8 %
Azotite restant.	0gr356
Soit.	33 %
Réaction (après culture).	alcaline.

Si nous remplaçons la glycérine par de l'acide lactique et que nous fassions entrer en combinaison ce dernier avec l'ammo-

niaque, nous aurons dans un seul corps, le lactate d'ammoniaque, à la fois l'aliment carboné et le composé azoté :

Peptone COLLAS.	1gr
Lactate d'ammoniaque renfermant : Acide lactique.	1 ^{cs} 50
AzO ³ K	1gr
Eau	Q. S. pour 100 ^{cs}

Ce milieu est resté à l'étuve aussi longtemps que le milieu précédent, et les résultats obtenus, quoique positifs, ne sont pas plus brillants :

Azotate avant	1gr
— après	0gr98
— détruit	0gr02
Soit	2 %
Azotite restant	0gr036
Soit	5,6 %
Réaction (après culture).	neutre.

L'ammoniaque est donc très nettement moins favorable à la décomposition des nitrates que le glyocolle.

Les autres composés amidés ou aminés qui ont servi à nos expériences ont été choisis parmi ceux qu'il est possible d'obtenir le plus facilement à l'état pur; nous les avons introduits dans les milieux les plus simples parmi ceux qui nous ont donné des résultats positifs jusqu'à présent, en nous contentant de remplacer dans ces milieux le glyocolle par le corps amidé à essayer.

La constante nutritive est celle que nous avons déjà indiquée maintes fois :

Peptone COLLAS.	1gr
Substance amidée ou aminée.	0gr25
Aliment carboné.	1gr50
AzO ³ K	1gr
CO ³ KH.	Q. S. pour alcaliniser.
Eau.	Q. S. pour 100 ^{cs}

Dans le tableau suivant, nous indiquons la substance amidée ou aminée employée et l'aliment carboné, avec, en regard, les chiffres obtenus aux dosages. (*Voir page 81.*)

En remplaçant les acides amidés par l'urée, les quantités d'azotate détruit sont beaucoup moins élevées, mais très supérieures néanmoins à celles trouvées pour les milieux à base de sels ammoniacaux. La faiblesse de ces résultats nous a amené à faire plusieurs essais avec différents aliments carbonés qui avaient provoqué, dans d'autres expériences, des décompositions assez complètes de nitrate.

	AZOTATE				AZOTITE		RÉACTION après culture.
	Avant.	Après.	Détruit.	°/o.	Restant.	°/o.	
	gr.	gr.	gr.		gr.		
Glycocolle + glycérine	1 03	0 877	0 153	14,9	»	»	Alcaline.
Leucine + glycérine	1 03	0 920	0 110	10,7	»	»	Alcaline.
Tyrosine + glycérine	1 12	0 94	0 18	16,2	0 245	21,8	Alcaline.
Asparagine + glycérine	1 03	0 90	0 13	12,7	»	»	Alcaline.
Alanine + glycérine	1 07	0 94	0 13	12,2	0 190	17,7	Alcaline.
Carnine + glycérine	1 12	0 94	0 18	16,1	0 238	23,0	Alcaline.
Créatine + glycérine	1 36	0 94	0 42	30,9	0 286	21,0	Alcaline.
Créatinine + glycérine	1 24	0 98	0 26	21,0	0 361	28,9	Alcaline.
Acide glutamique + glycérine	1 16	0 96	0 20	17,3	0 333	28,7	Alcaline.
	1 16	0 98	0 18	15,6	0 313	26,9	Alcaline.
	1 13	0 97	0 18	15,7	0 286	24,8	Alcaline.

L'urée est néanmoins un corps donnant de bons résultats.

	AZOTATE				AZOTITE		RÉACTION après culture.
	Avant.	Après.	Détruit.	%.	Restant.	%.	
	gr.	gr.	gr.		gr.		
Urée + acide lactique	1 07	1 03	0 04	4,0	0 435	40,0	Alcaline.
Urée + glucose	1 23	1 14	0 09	7,4	0 197	16,0	Alcaline.
Urée + glycérine	1 31	1 20	0 11	8,4	0 418	31,0	Alcaline.

Toutes ces cultures ayant été faites sur des milieux obtenus avec des produits chimiques purs, nous avons voulu nous rendre compte si, dans un bouillon renfermant à la fois la plupart des éléments provenant de la désagrégation de la molécule albuminoïde, c'est-à-dire présentant une composition plus voisine de celle d'un bouillon naturel, nous n'obtiendrions pas des résultats meilleurs. Là, en effet, ce n'est plus un seul corps amidé, mais tous les corps amidés susceptibles d'être produits par la digestion de l'albumine, que nous allons trouver, même ceux que les connaissances chimiques actuelles n'ont pas encore permis d'isoler.

Pour cela, dans de l'eau peptonée à 1 %, nous avons introduit un grand nombre de petits cubes d'albumine d'œuf coagulée par la chaleur; le tout a été placé dans un flacon plat, à grande surface, stérilisé, ensemencé avec une culture jeune de *Bacillus Subtilis* et placé à l'étuve à + 37°.

Le *B. Subtilis* jouit, en effet, de la propriété de digérer l'albumine.

Après une quinzaine de jours, l'albumine ayant totalement disparu, le milieu a été stérilisé et additionné des substances suivantes :

Peptone COLLAS.	1gr
Glycérine.	1 ^{cs} 50
CO ³ KH.	Q. S. pour alcaliniser.
AzO ³ K	1gr
Bouillon de digestion du Subtilis	Q. S. pour 100 ^{cs}

Après ensemencement par le *B. Coli* et séjour de trente et un jours à l'étuve, nous avons procédé à l'analyse dont voici les résultats :

Azotate avant	1gr03
— après	0gr936
— détruit.	0gr094
Soit.	9,2 %
Azotite restant.	0gr166
Soit.	16,1 %
Réaction (après culture)	alcaline.

D'après ces chiffres, il semble parfaitement inutile d'essayer de réunir dans un même milieu plusieurs corps amidés : les essais que nous ferions ne pouvant donner en aucun cas un milieu plus complexe que le milieu précédent.

Les bactéries dénitrifiantes indirectes peuvent donc détruire jusqu'à près d'un tiers de la quantité d'azotate mise à leur disposition. Peuvent-elles, dans des conditions encore meilleures, détruire la totalité de ce sel, comme le font les bactéries dénitrifiantes directes, type *B. Pyocyaneus*?

Elles le pourront peut-être si nous mettons à leur disposition une quantité suffisante des substances par l'intermédiaire desquelles elles effectuent cette décomposition.

C'est ce que nous avons cherché à démontrer en établissant un milieu renfermant une quantité relativement élevée de glycolle et d'acide lactique.

Nous avons préparé, d'après ces données, le milieu suivant :

Peptone COLLAS.	1gr
Glycolle	1gr50
Acide lactique bouilli.	3 ^{cs}
NaOH	Q. S. pour alcaliniser.
AzO ³ K	1gr
Eau	Q. S. pour 100 ^{cs}

Ce milieu est resté à l'étuve jusqu'à ce que le dégagement

gazeux ait complètement cessé. Nous avons été ainsi amené à l'y laisser pendant cent sept jours. Au bout de ce temps, il ne se dégageait plus aucune bulle gazeuse, et le milieu était redevenu complètement limpide; les bacilles formaient un dépôt abondant au fond du matras. Ils avaient donc épuisé tous les éléments nutritifs du milieu.

Les dosages habituels ont alors été effectués et nous ont donné :

Azotate avant	1gr89
— après.	1gr49
— détruit.	0gr40
Soit	21,1 %
Azotite restant.	0gr129
Soit	6,7 %
Réaction (après culture)	nettement alcaline.

Dans les conditions les plus favorables pour la destruction du nitrate, le *Bacterium Coli* n'arrive pas à détruire une quantité de nitrate supérieure à celle qu'il détruisait dans les autres milieux essayés jusqu'à ce jour.

Cette expérience creuse donc un fossé profond entre les bacilles dénitrifiants directs et les bacilles dénitrifiants indirects.

Restait enfin une dernière question à examiner.

Si nous nous reportons aux premières expériences publiées par GRIMBERT en 1898, nous remarquons que lorsqu'il employait de l'eau peptonée à 1 %, il n'obtenait aucune destruction de nitrate, tandis que s'il élevait la proportion de peptone à 5 %, il obtenait une décomposition atteignant jusqu'à 6, 32 % du nitrate avec le *Coli* et 2, 10 % avec l'ÉBERTH. De semblables résultats ne pouvaient s'expliquer que par la présence d'une petite quantité de produits amidés dans la peptone. GRIMBERT avait émis cette hypothèse et la prouvait en effectuant un dosage approximatif des substances amidées au moyen de l'hypobromite; il avait ainsi obtenu 13 cm³ 8 d'azote amidé pour 125 cm³ de solution peptonée à 1 %.

L'important travail de A. RONCHÈSE (36), nous fournissant un procédé très exact pour le dosage des composés amidés et de l'ammoniaque, nous avons appliqué celui-ci à nos essais.

Nous avons ainsi trouvé que 1 gr. de peptone COLLAS pouvait contenir jusqu'à 0. gr. 01632 d'ammoniaque totale.

Si, de ce chiffre, nous retirons la quantité correspondant à

l'ammoniaque, nous avons la quantité d'acides amidés contenus dans la peptone.

Le procédé d'AUBIN et ALLA qui dose l'ammoniaque seule, nous donne en effet 0 gr. 000 438 pour 1 gr. de peptone.

En retirant ce chiffre de celui trouvé pour l'ensemble des composés amidés :

$$0\text{gr}01632 - 0\text{gr}000438 = 0\text{gr}015882.$$

nous avons la quantité d'ammoniaque correspondant aux acides amidés seuls.

Si donc le *B. coli* ne peut arriver à détruire le nitrate lorsqu'il est en présence d'eau peptonée seule, il ne peut le faire uniquement que parce qu'il n'a pas une quantité suffisante de substances amidées à sa disposition.

Quant à l'aliment carboné nécessaire à la décomposition du nitrate, la peptone en renferme sous forme d'acide lactique ou d'autres acides alcools, puisqu'elle donne la réaction des acides alcools avec le réactif d'UEFFELMAN ¹ et avec le réactif de BERG.

Là encore se trouve une nouvelle confirmation de nos observations.

1. Voir les formules de ces réactifs page 56.

XI

COMPOSITION DES GAZ DÉGAGÉS PENDANT LA DESTRUCTION DU NITRATE

Nous avons recueilli les gaz dégagés pendant le séjour à l'étuve de tous les milieux de culture; nous avons ainsi constaté que toutes les fois qu'il y a destruction de nitrate, il y a dégagement gazeux, mais que la présence d'un dégagement gazeux n'est nullement la preuve de la destruction du nitrate. Il suffit en effet que l'aliment carboné puisse subir directement la fermentation sous l'action des bactéries pour qu'il se produise des gaz provenant de la décomposition de cet aliment carboné.

Inversement, s'il ne se produit aucune bulle gazeuse pendant la durée du séjour à l'étuve, nous pouvons toujours affirmer qu'il n'y a pas eu dénitrification. Tous les dosages de nitrate, après culture, dans les milieux qui n'avaient pas dégagé de gaz, nous ont invariablement donné le même chiffre de nitrate que celui trouvé avant culture.

La quantité de gaz recueillie n'est pas proportionnelle à la quantité de nitrate détruit. Il ne saurait d'ailleurs en être autrement puisque les gaz venant de la destruction du nitrate sont toujours mélangés aux gaz provenant de la fermentation de l'aliment carboné, et la somme de ces deux espèces de gaz est essentiellement variable suivant la nature de l'aliment carboné et suivant le pourcentage de celui-ci par rapport à l'unité de volume du milieu de culture.

Nous n'aurons donc aucune conclusion à tirer de l'examen des quantités de gaz dégagés, seule la nature de ceux-ci nous semble susceptible de présenter quelque intérêt.

Après chaque opération, nous avons conservé avec le plus grand soin la totalité des gaz dégagés et nous les avons trans-

portés avec la pipette de SALET dans des flacons à l'émeri bien rodés que nous avons ensuite paraffinés pour assurer leur parfaite étanchéité.

L'analyse des gaz a été effectuée suivant les méthodes générales employées en pareil cas. Nous les rappelons ici en quelques lignes : Un volume du mélange de gaz est introduit dans une cloche graduée en dixièmes de centimètre cube. Ce volume est exactement noté ainsi que la température et la pression existantes au moment de l'expérience.

Cette mesure est faite en présence d'un excès d'eau afin d'éviter la correction due à la tension de la vapeur d'eau.

Une pastille de potasse est introduite dans la cloche avec une goutte d'eau ; le tout est agité vigoureusement, et lorsqu'on constate que le volume a cessé de diminuer, on le note. Ce nouveau volume donne, par différence avec le premier, le volume d'acide carbonique.

Dans la même cloche, nous introduisons ensuite au moyen d'un petit tube spécial, un petit volume de solution d'acide pyrogallique. Après nouvelle agitation et nouvelle lecture, nous avons, par différence avec le volume lu après action de la potasse, la quantité d'oxygène contenue dans la prise d'essai.

Dans une autre prise d'essai nous introduisons une petite quantité de solution saturée de sulfate ferreux destinée à absorber le bioxyde d'azote ; nous agitions, et le volume lu nous donne par différence avec le volume de la prise d'essai, la quantité de bioxyde d'azote contenue dans celle-ci.

Enfin une autre prise d'essai est introduite dans un eudiomètre et exactement mesurée. A celle-ci, on ajoute un volume connu d'oxygène, suffisant pour assurer la combustion totale de l'hydrogène. Le nouveau volume donné par le mélange de ces gaz est lu et noté ; après passage de l'étincelle, ce volume est encore lu et noté.

Cette expérience nous permet de rechercher à la fois l'hydrogène et le protoxyde d'azote.

Pour un certain nombre de milieux, nous avons fait un dosage de l'acide carbonique seul, destiné à nous donner une idée de la proportion dans laquelle celui-ci existait dans le mélange gazeux, le résidu était mesuré et le chiffre trouvé considéré comme azote.

Comme nous le verrons tout à l'heure, le résidu est presque exclusivement constitué par ce dernier gaz.

Dans le tableau ci-dessous, nous donnons les résultats de ces dosages :

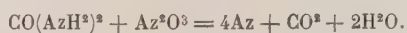
	GAZ total.	AZOTE		CO ²		AZOTE correspon- dant au nitrate détruit.
		Quan- tité trouvée	%.	Quan- tité trouvée	%.	
		cm ³ .	cm ³ .	cm ³ .	cm ³ .	
Glycocolle + lactose	88,1	43,2	49	44,9	51	19,2
Lactate d'ammoniaque	11,9	11,6	77	3,3	23	2,1
Phosphate d'ammoniaque	44,2	25,9	58	18,3	42	5,3
Glycocolle + acide lactique.	32,9	23,5	71	9,4	29	9,6
Urée + acide lactique.	14,6	8,9	59	5,7	41	4,0
Urée + glycérine.	47,5	26,6	56	20,9	44	12,0
Urée + glucose.	90,3	26,1	30	64,2	70	9,9
Alanine + glycérine.	179,6	97,4	55	82,2	45	46,4
Glycocolle + glucose.	129,9	45,9	35	84,0	65	19,2
Leucine + glycérine	97,8	60,9	62	36,9	38	19,2

Voici maintenant les chiffres qui nous ont été donnés par l'analyse complète des gaz dégagés par quelques cultures; nous avons pris, pour ces expériences également, des milieux appartenant à des types variés afin d'obtenir des résultats plus concluants.

	URÉE + GLUCOSE		ALANINE + GLYCÉRINE		GLYCOCOLLE + GLUCOSE		LEUCINE + GLYCÉRINE	
	Quantité absolue.	%.	Quantité absolue.	%.	Quantité absolue.	%.	Quantité absolue.	%.
	cm ³ .		cm ³ .		cm ³ .		cm ³ .	
Gaz total	90,31	»	179,61	»	129,9	»	97,88	»
CO ²	64,2	70,7	82,2	45,7	84,0	64,6	36,9	37,7
Oxygène.	0	»	0	»	2,0	1,6	0,49	0,5
Hydrogène.	0	»	0	»	0	»	0	»
Bioxyde d'Az.	4,3	4,9	1,7	1,0	3,2	2,5	0,49	0,5
Protoxyde d'Az.	0	»	0	»	0	»	0	»
Azote	21,81	24,3	95,71	53,2	40,7	31,3	60,0	61,3
Azote de l'azotate détruit	9,60	»	46,40	»	19,20	»	19,20	»

Donc, dans toutes ces cultures, plus de la moitié du gaz dégagé est composée d'acide carbonique qui provient à la fois de la décomposition de l'aliment carboné et de la réaction de l'acide nitreux sur le corps amidé; la presque totalité du gaz restant est composée d'azote provenant moitié du nitrate décomposé, moitié

du corps amidé introduit dans le milieu, ainsi que GRIMBERT l'a publié en 1898, d'après la réaction.



Il se produit quelquefois une très petite quantité d'oxygène.

Il se dégage toujours un peu de bioxyde d'azote et jamais de protoxyde d'azote ni d'autres composés oxygénés de l'azote. Ce bioxyde d'azote provient selon toute vraisemblance de l'action des acides formés dans la fermentation des hydrates de carbone sur l'acide nitreux, lequel se décompose en dégageant du bioxyde d'azote.

Enfin il ne se dégage jamais d'hydrogène.

XII

CONCLUSIONS

Nous citerons tout d'abord les conclusions du travail publié par M. le professeur GRIMBERT en 1898 (*C. R. de la Société de Biologie*, t. L, p. 1135), conclusions que nos propres expériences ont confirmées de tous points :

1° Chaque fois que le B. Coli ou le B. d'EBERTH ont donné un dégagement gazeux dans un milieu nitraté, le volume de l'Azote recueilli a toujours été supérieur au moins du double à celui qui correspond à l'azotate détruit. Par conséquent, *l'Azote dégagé ne provient pas exclusivement du nitrate.*

2° L'action dénitrifiante de ces bacilles est corrélative de la présence de matériaux amidés dans la culture.

3° Elle semble résulter de l'action secondaire qu'exerce sur ces substances l'*acide nitreux* formé par les bactéries.

4° La présence de nitrite n'entrave pas les fonctions du B. Coli ni du B. d'EBERTH, puisqu'ils se développent très bien dans des milieux renfermant 1 % de ce sel et y dégagent de l'Azote en quantité égale sinon supérieure à celle qu'ils produisent dans le même milieu additionné de nitrate.

L'ensemble de nos recherches nous permet de compléter ces conclusions par les suivantes :

5° Pour que les bacilles d'EBERTH et d'ESCHERICH soient capables de décomposer les nitrates, il faut que le milieu contienne à la fois une substance aminée ou amidée et un *aliment carboné fermentescible.*

6° La dénitrification indirecte réalisée par ces deux bactéries comporte deux phases distinctes :

a) dans la première, le nitrate est réduit en nitrite par les bactéries, phénomène d'ordre purement biologique;

b) dans la seconde, le nitrite formé, se trouvant en présence

de matériaux amidés ou aminés, est détruit par la production d'acide provenant de la fermentation de l'aliment carboné. En effet, l'acide agissant sur le nitrite provoque immédiatement la réaction de l'acide nitreux sur le corps aminé; d'où mise en liberté d'Azote et de CO_2 , pendant que l'acide se combine à l'alcali du nitrite, d'où *neutralité* persistante du milieu.

7° Le B. Coli est parfaitement capable, dans les conditions que nous avons indiquées et qui sont très souvent réalisées dans la nature, de décomposer à lui seul les nitrates sans le secours d'aucune symbiose bactérienne, contrairement à ce qu'affirment BURRI et STUTZER et MAZANIELLO CINGOLEANI.

8° L'acide carbonique ne peut en aucun cas déplacer l'acide nitreux ni, à plus forte raison, l'acide nitrique de leurs combinaisons, contrairement aux conclusions de WOLF.

9° La théorie de STOKLASA sur le rôle de l'alcool dans la dénitrification n'est nullement applicable à la dénitrification *indirecte*.

10° Il en est de même de l'hypothèse de MARPMANN, qui attribue à l'hydrogène produit par les bactéries le principal rôle dans la réduction des nitrates. Nous n'avons, en effet, jamais pu constater la présence d'hydrogène dans les gaz provenant de nos cultures.

11° Nous ne pouvons pas non plus envisager au même point de vue que JENSEN le rôle des aliments carbonés dans le processus de la dénitrification *indirecte*. Ce n'est pas, en effet, par leurs propriétés plus ou moins énergétiques que ceux-ci interviennent dans la réaction, mais par la plus ou moins grande facilité qu'ils ont d'être attaqués par la bactérie dénitrifiante, pour produire un ou des acides.

12° Enfin, au cours de ce travail, nous avons été amené à constater un fait qui, à notre connaissance, n'avait pas encore été signalé, nous voulons parler de la fermentation de l'acide lactique sous l'action du Colibacille.

Vu : bon à imprimer :

Le Président de la Thèse,

L. GRIMBERT

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-recteur de l'Académie de Paris,

Vu :

L. LIARD

Le Directeur de l'École,

L. GUIGNARD

BIBLIOGRAPHIE

1. AMPOLA et GARINO. Sur la dénitrification. *Rendiconti Accad. Lincei*, 1895, V, 2^e sem., 10 et 90, d'après *Centralbl. f. Bakt.*, 2 Abt., 1896, 2, n° 21, 670.
2. G. AMPOLA et C. ULPANI. Sulla denitrificazione. *Gazzetta chimica italiana*, 1898, 28, 411.
3. ANGUS SCHMITH. Mem. lit. and phil. *Soc. Manchester*, 1867, 4, 56.
4. ANGUS SCHMITH. Sur la pollution des rivières. Report of the medical officer of the local government board, 1882 et 1884, d'après WARINGTON. *J. of the chemical Soc. of London*, 1888, 53, 742.
5. BOUTRON. Des bactéries dénitrifiantes. *Thèse de pharmacien supérieur*, Paris, 1904, JOANNIN et C^{ie}.
6. BRÉAL. De la présence dans la paille d'un ferment aérobie réducteur des nitrates. *C. R.*, 1892, 114, 681.
7. BRÉAL. Réduction des nitrates dans la terre arable. *Ann. agronomiques*, 1895, 22, 32.
8. R. BURRI et A. STUTZER. Ueber Nitrat zerstörende Bakterien und dem durch dieselben bedingten Stickstoffverlust. *Centralb. für Bakt. und Parasitenkunde*, 2 Abt., 1895, nos 7, 8, 9, 10, 11, 12.
9. MAZANIELLO CINGOLEANI. *Gazzetta chimica italiana*, 1, 64, 1909.
10. DEHÉRAIN et MAQUENNE. Sur la réduction des nitrates dans la terre arable. *C. R. Ac. Sc.*, 1882, 95, 691-732.
11. DEHÉRAIN. *Ann. agronomiques*, 1888, 14, 97.
12. DUCLAUX. *Chimie biologique*, 1883, 714.
13. EGUNOW. La dénitrification aérobie pendant la germination des graines. Mémoires de l'Institut agronomique et forestier de Nowo-Alexandria (Russie), 1895, 10, d'après SEWERIN, *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1897, 3, 505.
14. PERCY FRANKLAND. The action of some specific microorganisms on nitric acide. *Journ. of the Chem. Society of London*, 1888, 373-391.
15. PERCY FRANKLAND. A gasometric method of determining nitrous acid. *Journ. of the Chem. Society of London*, 1888, 53, 364.
16. HARTWIG FRANZEN. Beiträge zur Biochemie der Mikroorganismen *Hoppe Seyler's Zeitschrift f. physiologische Chemie*, 6 Band, 1 Heft, 1909, p. 52.
17. JOSEPH GALLIMARD. Quelques recherches nouvelles sur les cultures microbiennes en milieux chimiquement définis. *Thèse de doct.*, Lyon, 1907, Imprimeries réunies.
18. GAYON et DUPETIT. Sur la fermentation des nitrates. *C. R.*, 1882, 95, 644.
19. GAYON et DUPETIT. Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniment petits. *Ann. de la Soc. agron.*, 1885, 1, 226, et BERGER-LEVRAULT et C^{ie}, Nancy, 1886.

20. GILTAY et ABERSON. Recherches sur un mode de dénitrification et sur le schizomycète qui la produit. *Archives néerlandaises*, 1892, **25**, 341-361.
21. L. GRIMBERT. Action du B. coli et du B. d'EBERTH sur les nitrates. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1898, 67, et *C. R. de la Soc. de biol.*, 2 avril 1898.
22. L. GRIMBERT et M. BAGROS. *C. R. de la Soc. de biol.*, **66**, 760, 15 mai 1909.
23. HERŒUS. *Zeitschrift f. Hygiene*, 1886, **1**, 215.
24. HJALMAR JENSEN. Das Verhältnis der denitrifizieren den Bakterien zu einigen Kohlenstoffverbindungen. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1897, **3**, nos 23, 24, 25, 26, 624.
25. H. JENSEN. Beiträge zur Morphologie und Biologie der Denitrifikationsbakterien. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1898, **4**, 401.
26. H. JENSEN. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1897, **3**, 622.
27. H. JENSEN. Denitrifikationsbakterien und Zucker. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1899, **5**, 716.
28. JOULIE. *Ann. agric.*, 1884, **10**, 289.
29. LAURENT. Réduction des nitrates par les végétaux. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1900, 722.
30. MARPMANN. Ueber Denitrifikationvorgänge. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1899, **5**, 67-70.
31. MEUSEL. De la putréfaction produite par les bactéries en présence des nitrates alcalins. *J. Ph. et Ch.*, 4^e série, 1875, **22**, 430.
32. J. H. M. MUNRO. The formation and destruction of nitrates and nitrites in artificial solutions and in river and well water. *Journ. of the Chem. Soc. of London*, 1886, **49**, 632.
33. MÜNTZ. *Ann. Ch. et Ph.*, 1887, **11**, 125.
34. REISET. Note sur la production du gaz nitreux pendant la marche de la fermentation du jus de betterave. *C. R. Ac. Sc.*, 1868, **66**, 177.
35. REISET. *C. R.*, 1888, **108**, 708.
36. A. RONCHÈSE. Méthodes de dosage de quelques composés azotés. *Thèse de doct. univ.*, Paris, 1908, 18. LAHURE.
37. P. SALZMANN. Chemisch physiologische Untersuchungen über die Lebensbedingungen von zwei Arten denitrifizieren der Bakterien und der Streptothrix odorifera (*Dissertation Königsberg*). *Refer. in. Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1902, **8**, 348.
38. SCHIROKIKH. Ueber einen neuen Salpeter zertorende Bacillus. *Centralb. f. Bakt.*, Abt., 1896, **2**, 204.
39. TH. SCHLOESING. *C. R. Ac. Sc.*, 1868, **66**, 237.
40. TH. SCHLOESING. Études sur la nitrification. *C. R. Ac. Sc.*, 1873, **77**, 207-353.
41. TH. SCHLOESING et A. MÜNTZ. Recherches sur la nitrification. *C. R.*, 1879, **89**, 1076.
42. SCHNEIDEWIND. Halle. Welche Factoren spielen bei der Salpeterzersetzung im Ackerboden eine Rolle? — *Verhandlungen der Gesellschaft deutscher Naturforscher und Aertze*, 2 Theil, 1898, 1^{re} Hälfte, 140.
43. SEWEHRIN. Die im Miste vorkommen Bakterien und deren physiologische Rolle bei der Zersetzung desselben. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1895, **1**, 162 et 805.
44. ALPH. SPRINGER. *Ber. d. d. chem. Gess.*, **16**, **1**, 1228, d'après BURRI et STUTZER, *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1895, **1**, 260.
45. STUTZER et HARTLEB. *Mitteilung der landwirtsch. Institute der Königlichen Universität*, Breslau, 1899, **1**, d'après JENSEN.

46. A. STUTZER et R. MAUL. Ueber Nitraterstörende Bakterien. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1896, **2**, 473.
47. STOKLASA. Ueber die Nitratgährung und ihre Bedeutung in den biologischen Prozessen der Bodens. *Deutsche landwirtschaftliche Presse*, 1901, n° 79, 81. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1901, **7**, 936.
48. STOKLASA et VITEK. Beiträge zur Kenntniss der Einflusses verschiedener Kohlenhydrate und organischer Säuren auf die Metamorphose d. Nitrats durch Bakterien. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., **14**, 102-183, 1905.
49. TACKE. Sur le dégagement d'azote libre pendant la putréfaction. *Ann. agron.*, **15**, 1889, 185, d'après *Landwirtschaftl. Jahrb.*, **16**, 939. •
50. ROBERT WARINGTON. On nitrification. *J. of the Chem. Soc. of London*, 1879, **35**, 429.
51. VIVIER. Action de l'acide nitreux sur l'urée. *C. R.*, 1888, **106**, 138.
52. R. WARINGTON. *J. royal Agric. Society*, 1881, 322.
53. R. WARINGTON. On nitrification. *J. of the chem. Soc. of London*, 1884, **45**, Déc., et *Ann. agron.*, 1885, **11**, 49.
54. R. WARINGTON. The chemical actions of some microorganisms. *J. of the Chem. Soc. of London*, 1888, **53**, 727.
55. WAGNER (de Darmstadt), d'après BURRI et STUTZER. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt. 1895, **1**, 259.
56. HUGO WEISSEMBERG. Studien über Denitrifikation. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt. 1898, **4**, 42, d'après *Arch. f. Hygiene*, 1897, **30**, 4 Heft. 275.
57. H. WEISSEMBERG. Ueber die Denitrifikation. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1902, **8**, 166.
58. H. WEISSEMBERG. *Arch. f. Hygiene*, 1897, **21**, 275.
59. KURTIS WOLF. Ueber Denitrifikation. *Hygienische Rundschau*, 1899, **9**, Jahrgang, 538. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1899, **5**, 682.
60. K. WOLF. Denitrifikation und Gährung. *Hygienische Rundschau*, 1899, **9**, n° 23. *Centralb. f. Bakt.*, 2 Abt., 1900, **6**, 160.
61. K. WOLF. *Hygienische Rundschau*, **9**, 538 et 1169.
-

TABLE

	Pages.
AVANT-PROPOS	9
I. Historique	11
II. Appareils et méthodes de dosages.	39
Dosage du nitrate.	41
Dosage du nitrite.	43
III. Milieux de culture artificiels employés pour l'étude du mécanisme de la dénitrification par le B. Coli.	45
IV. Action de l'acide carbonique sur les solutions de nitrites.	47
V. Influence de l'aliment carboné.	49
I. — Aliment ternaire	49
1. Glycérine et autres composés alcooliques	49
2. Matières sucrées.	52
3. Acides organiques divers.	55
II. — Autres aliments carbonés.	59
VI. Influence des sels minéraux.	63
VII. Rôle des acides aminés seuls.	65
VIII. Influence combinée des acides amidés et des substances salines.	69
IX. Influence des acides aminés en présence d'un aliment carboné.	70
A. Glycérine.	70
B. Glucose.	72
C. Lactose.	72
D. Saccharose	73
E. Glycogène.	73
F. Acides alcools.	73
α . Acide lactique.	74
β . Acides tartrique et citrique	75
G. Acide valérianique.	75
X. Remplacement du glyocolle par d'autres corps aminés et amidés.	79
XI. Composition des gaz dégagés pendant la destruction du nitrate.	85
XII. Conclusions.	89
BIBLIOGRAPHIE.	91

